

| | | | |
|---------------------------|------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テグメント* (参考) |
| A 6 1 K 38/21 | | A 6 1 K 39/395 | 4 C 0 7 6 |
| 39/395 | | 47/48 | 4 C 0 8 4 |
| 47/48 | | A 6 1 P 1/16 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 P 1/16 | | 9/00 | 4 H 0 4 5 |
| 9/00 | | 29/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 93 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-----------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2000-576887(P2000-576887) | (71) 出願人 | バイオジェン インコーポレイテッド B I O G E N I N C O R P O R A T E D |
| (86) (22) 出願日 | 平成11年10月15日 (1999.10.15) | | アメリカ合衆国、マサチューセツ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成13年4月12日 (2001.4.12) | | 02142、ケンブリッジ、ケンブリッジ セ |
| (86) 国際出願番号 | P C T / U S 9 9 / 2 4 2 0 1 | | ンター 14 |
| (87) 国際公開番号 | W O 0 0 / 2 3 1 1 4 | (72) 発明者 | ベビンスキー、 ブレイク |
| (87) 国際公開日 | 平成12年4月27日 (2000.4.27) | | アメリカ合衆国 マサチューセツ |
| (31) 優先権主張番号 | 6 0 / 1 0 4 , 5 7 2 | | 02174、 アーリントン、 ファルマウス |
| (32) 優先日 | 平成10年10月16日 (1998.10.16) | | ロード 30 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | (74) 代理人 | 弁理士: 大塩 竹志 |
| (31) 優先権主張番号 | 6 0 / 1 2 0 , 1 6 1 | | |
| (32) 優先日 | 平成11年2月16日 (1999.2.16) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロン-β-1 a のポリマー結合体および使用

(57) 【要約】

ポリアルキレングリコールを含むポリマーに連結されたインターフェロン-β-1 a を含む、インターフェロン β ポリペプチド。ここで、このインターフェロン-β-1 a およびポリアルキレングリコール部分は、インターフェロン-β-1 a がインターフェロン β の別の治療形態 (インターフェロン-β-1 b) と比較して、増強された活性を有し、そして非結合体化インターフェロン-β-1 a と比較して、活性の減少を示さないように配置されている。本発明の結合体は、治療適用および非治療 (例えば、診断) 適用において有用に使用される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然に存在しないポリマーに連結されたグリコシル化インターフェロン β を含む組成物であって、該ポリマーがポリアルキレングリコール部分を含む、組成物。

【請求項2】 請求項1に記載の組成物であって、前記ポリアルキレン部分が、アルデヒド基、マレイミド基、ビニルスルホン基、ハロアセテート基、複数のヒスチジン残基、ヒドラジン基およびアミノチオール基から選択される基により、インターフェロン β に連結されている、組成物。

【請求項3】 請求項1に記載の組成物であって、前記グリコシル化インターフェロン β が、インターフェロン $\beta-1a$ であり、そして抗ウイルスアッセイにおいて測定した場合にインターフェロン $\beta-1b$ より活性がある、組成物。

【請求項4】 請求項3に記載の組成物であって、前記インターフェロン $\beta-1a$ が、抗ウイルスアッセイにおいて測定した場合に前記ポリマーを欠如するインターフェロン $\beta-1a$ の0.5～1倍の効力を保持する、組成物。

【請求項5】 前記インターフェロン β が、インターフェロン $\beta-1a$ 融合タンパク質である、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】 前記インターフェロン $\beta-1a$ 融合タンパク質が免疫グロブリン分子の一部を含む、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記インターフェロン β が、以下の特性のうちの少なくとも1つを有する、変異体インターフェロン β である、請求項1または5に記載の組成物：(a) 該変異体は、野生型インターフェロン $\beta-1a$ より高い抗ウイルス活性を有し、ここで該抗ウイルス活性が、ウイルス誘導性の細胞溶解により測定される；(b) 該変異体が、野生型インターフェロン $\beta-1a$ と比較して、抗増殖活性より大きな抗ウイルス活性を有する；(c) 該変異体がインターフェロンレセプターに結合するが、野生型インターフェロン $\beta-1a$ と比較した場合、レセプター結合活性と比較して、低下した抗ウイルス活性および低下した抗増殖活性を有する。

【請求項8】 ポリアルキレングリコール部分を含むポリマーに連結された

生理学的に活性なインターフェロン- β -1 aを含む、生理学的に活性なインターフェロン- β 組成物であって、該生理学的に活性なインターフェロン- β 組成物中の該生理学的に活性なインターフェロン- β -1 aが、抗ウイルスアッセイによって測定された場合に、生理学的に活性なインターフェロン- β -1 bと比較して増強した活性を有するように、該生理学的に活性なインターフェロン- β -1 aおよび該ポリアルキレングリコール部分が配置されている、組成物。

【請求項9】 前記インターフェロン- β -1 aが、該インターフェロン- β -1 a上のN末端のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 前記インターフェロン- β -1 aが、該インターフェロン- β -1 a上のC末端またはその付近のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項8に記載の組成物。

【請求項11】 前記インターフェロン- β -1 aが、該インターフェロン- β -1 aのグリカン部分を介してある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項8に記載の組成物。

【請求項12】 前記インターフェロン- β -1 aが、インターフェロン- β -1 a融合タンパク質である、請求項8に記載の組成物。

【請求項13】 前記インターフェロン- β -1 a融合タンパク質が、免疫グロブリン分子の一部を含む、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】 請求項8または12に記載の組成物であって、前記インターフェロン- β -1 aは以下の特性のうち少なくとも1つを有する変異体インターフェロン- β -1 aである、組成物：(a) 該変異体は、野生型インターフェロン- β -1 aより高い抗ウイルス活性を有し、ここで該抗ウイルス活性が、ウイルス誘導性の細胞溶解により測定される；(b) 該変異体が、野生型インターフェロン- β -1 aと比較して、抗増殖活性より大きな抗ウイルス活性を有する；(c) 該変異体がインターフェロンレセプターに結合するが、野生型インターフェロン- β -1 aと比較した場合、レセプター結合活性と比較して、低下した抗ウイルス活性および低下した抗増殖活性を有する。

【請求項15】 ポリアルキレングリコール部分を含むポリマーにN末端で

連結された生理学的に活性なグリコシル化インターフェロン β を含む、生理学的に活性なインターフェロン β 組成物であって、該生理学的に活性なインターフェロン β 組成物中の該生理学的に活性なインターフェロン β が、抗ウイルスアッセイによって測定された場合に、該部分を欠如した生理学的に活性なインターフェロン β と比較して、実質的に類似の活性を有するように、該生理学的に活性なインターフェロン β および該ポリアルキレングリコール部分が配置されている、組成物。

【請求項 16】 前記インターフェロン β が、該インターフェロン β 上のN末端のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項 15に記載の組成物。

【請求項 17】 前記インターフェロン β が、該インターフェロン β 上のC末端またはその付近のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項 15に記載の組成物。

【請求項 18】 前記インターフェロン β が、該インターフェロン β のグリカン部分を介してある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項 15に記載の組成物。

【請求項 19】 前記インターフェロン β が、インターフェロン β 融合タンパク質である、請求項 15に記載の組成物。

【請求項 20】 前記インターフェロン β 融合タンパク質が免疫グロブリン分子の一部を含む、請求項 19に記載の組成物。

【請求項 21】 請求項 15または19に記載の組成物であって、前記グリコシル化インターフェロン β が、以下の特性のうち少なくとも1つを有する変異体インターフェロン β である、組成物：（a）該変異体は、野生型インターフェロン β -1aより高い抗ウイルス活性を有し、ここで該抗ウイルス活性が、ウイルス誘導性の細胞溶解により測定される；（b）該変異体が、野生型インターフェロン β -1aと比較して、抗増殖活性より大きな抗ウイルス活性を有する；（c）該変異体がインターフェロンレセプターに結合するが、野生型インターフェロン β -1aと比較した場合、該変異体のレセプター結合活性と比較して、低下した抗ウイルス活性および低下した抗増殖活性を有する。

【請求項 22】 ポリエチレングリコール部分に連結されたインターフェロン- β -1 a を含む、安定な水溶性の結合体化インターフェロン- β -1 a 複合体であって、該インターフェロン- β -1 a は、不安定な結合により該ポリエチレングリコール部分に連結され、該不安定な結合が、生化学的加水分解および/またはタンパク質分解により切斷可能である、複合体。

【請求項 23】 前記ポリマーが、約 5 ～ 約 40 キロダルトンの分子量を有する、請求項 1、15、または 22 に記載のインターフェロン- β 組成物。

【請求項 24】 請求項 23 に記載のインターフェロン- β 組成物を含む、薬学的組成物。

【請求項 25】 哺乳動物被験体において、潜在的または発症した、状態または疾患状態を、有効なインターフェロン- β -1 a を用いて処置する方法であって、該方法は、ポリエチレングリコール部分に連結されている該インターフェロン- β -1 a を含むインターフェロン- β -1 a 組成物の有効量を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 26】 前記インターフェロン- β -1 a が、該インターフェロン- β -1 a 上の N 末端のある部位で、前記ポリマーに連結されている、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 前記インターフェロン- β -1 a が、該インターフェロン- β -1 a 上の C 末端またはその付近のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】 前記インターフェロン- β -1 a が、該インターフェロン- β -1 a のグリカン部分を介してある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】 前記インターフェロン- β -1 a が、インターフェロン- β -1 a 融合タンパク質である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】 前記インターフェロン- β -1 a 融合タンパク質が免疫グロブリン分子の一部を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】 請求項 25 または 29 に記載の方法であって、前記インターフェロン- β -1 a は以下の特性のうち少なくとも 1 つを有する変異体インタ

ーフエロン $\beta-1a$ である、方法：(a) 該変異体は、野生型インターフェロン $\beta-1a$ より高い抗ウイルス活性を有し、ここで該抗ウイルス活性が、ウイルス誘導性の細胞溶解により測定される；(b) 該変異体が、野生型インターフェロン $\beta-1a$ と比較して、抗増殖活性より大きな抗ウイルス活性を有する；(c) 該変異体がインターフェロンレセプターに結合するが、野生型インターフェロン $\beta-1a$ と比較した場合、該変異体のレセプター結合活性と比較して、低下した抗ウイルス活性および低下した抗増殖活性を有する。

【請求項32】 インビゴ系またはインビトロ系でのインターフェロン $\beta-1a$ の活性を長期化する方法であって、該方法は、該インターフェロン $\beta-1a$ を、天然に存在しないポリマー部分に連結して、連結したポリマー-インターフェロン $\beta-1a$ 組成物を生成する工程、および該連結したポリマー-インターフェロン $\beta-1a$ 組成物を該インビゴ系または該インビトロ系に導入する工程を包含する、方法。

【請求項33】 前記インターフェロン $\beta-1a$ が、該インターフェロン $\beta-1a$ 上のN末端のある部位で、前記ポリマーに連結されている、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記インターフェロン $\beta-1a$ が、該インターフェロン $\beta-1a$ 上のC末端またはその付近のある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項32に記載の方法。

【請求項35】 前記インターフェロン $\beta-1a$ が、該インターフェロン $\beta-1a$ のグリカン部分を介してある部位で前記ポリマーに連結されている、請求項32に記載の方法。

【請求項36】 前記インターフェロン $\beta-1a$ が、インターフェロン $\beta-1a$ 融合タンパク質である、請求項32に記載の方法。

【請求項37】 前記インターフェロン $\beta-1a$ 融合タンパク質が免疫グロブリン分子の一部を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 請求項32または36に記載の方法であって、前記インターフェロン $\beta-1a$ は以下の特性のうち少なくとも1つを有する変異体インターフェロン $\beta-1a$ である、方法：(a) 該変異体は、野生型インターフェ

ン β -1 a より高い抗ウイルス活性を有し、ここで該抗ウイルス活性が、ウイルス誘導性の細胞溶解により測定される；(b) 該変異体が、野生型インターフェロ β -1 a と比較して、抗増殖活性より大きな抗ウイルス活性を有する；(c) 該変異体がインターフェロンレセプターに結合するが、野生型インターフェロ β -1 a と比較した場合、該変異体のレセプター結合活性と比較して、低下した抗ウイルス活性および低下した抗増殖活性を有する。

【請求項 3 9】 前記ポリマーがポリアルキレングリコールを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 0】 被験体における脈管形成を阻害する方法であって、該方法が、請求項 2 3 に記載の組成物の有効量を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

特定の疾患の全身処置に関するポリペプチドおよびタンパク質の使用は、今や、医学現場で十分に受け入れられている。これらの物質が治療において果たす役割は非常に重要であるので、組換えDNA技術による大量の合成に関して多くの研究活動が行われている。これらのポリペプチドの多くは、それらの生物学的作用を誘発する際に非常に強力かつ特異的な内因性分子である。

【0002】

意図された適用に関してこれらのタンパク質性物質の有用性を制限する主要な因子は、非経口的に与えられた場合、それらが短時間で体内から排出されてしまうことである。このことは、プロテアーゼによるか、または腎臓における濾過によるようなタンパク質排出のための正常な経路を用いるクリアランスによる代謝の結果として生じ得る。これらの物質の投与の経口経路は、胃におけるタンパク質分解に加えて、胃が高酸性であることにより、それらが意図された標的組織に達する前にそれらが破壊されるので、よりいっそう問題である。タンパク質のこれらの投与経路と関連した問題は、製薬産業において周知であり、そして種々の戦略がこの問題を解決するための試みにおいて用いられている。

【0003】

タンパク質安定性を扱う大量の研究が発表されている。ポリマー物質とタンパク質を結合体化する種々の方法が公知であり、これらの方法としては、デキストラン、ポリビニルピロリドン、糖ペプチド、ポリエチレングリコールおよびポリアミノ酸の使用が挙げられる。得られた結合体ポリペプチドは、非経口適用に関して、それらの生物学的活性および水溶性を維持することが報告されている。

【0004】

これまで多くの臨床研究の焦点であり、そしてその投与および生物同化を改善する取り組みの焦点であったペプチドファミリーは、インターフェロンである。インターフェロンは、種々の臨床疾患状態において試験されてきた。そのファミリーの1メンバーであるヒトインターフェロン β の使用は、多発性硬化症の処置

との間の配列における保存にも拘わらず、それらが、生化学的実体として異なり、従って、インターフェロニン- $\beta-1b$ について公知であることの多くが、インターフェロニン- $\beta-1a$ に適合し得ないことを示し、逆もまた然りである。

【0007】

(発明の要旨)

本発明者らは、非グリコシル化形態と比較してグリコシル化インターフェロニン- β の利点を利用した。特に、本発明者らは、インターフェロニン- $\beta-1b$ と比較して増加した活性を有するインターフェロニン- $\beta-1a$ 組成物を開発し、そしてこれはまた、一般に、結合体化されていないインターフェロニン- $\beta-1a$ 形態と比較して、事実上の活性喪失がない、PEG化 (pegylated) タンパク質の有効な (salutory) 特性を有する。従って、産物 (ポリマーインターフェロニン- $\beta-1a$ 結合体) がそれらの生物学的活性の全てまたは大部分を保持する方法で改変が行われる場合、以下の特性が生じ得る：増加した半減期および組織分布の改変 (例えば、長期間にわたり血管系にとどまる能力) を導く、変化した薬物動態学および薬力学；溶液における安定性の増加；免疫原性の減少；タンパク質分解消化からの保護；および活性のその後の消滅。このような処方方は、薬学分野および医学分野における実質的進歩であり、そしてインターフェロンがいくつかの有用性を有する種々の疾患 (例えば、多発性硬化症、線維症、ならびに他の炎症性疾患または自己免疫疾患、癌、肝炎、および他のウイルス性疾患) の管理に有意に寄与する。特に、血管系に長期間とどまる能力は、インターフェロニン- $\beta-1a$ を使用して、尿管形成を阻害し、そして潜在的に血液脳関門を通過させることを可能にする。さらに、ポリマーインターフェロニン- $\beta-1a$ 結合体を作製することによって得られる熱安定性は、吸入を介するその後の投与において使用するためにインターフェロニン- $\beta-1a$ を散剤形態に処方する場合、有利である。

【0008】

本発明者らは、インターフェロニン- $\beta-1a$ の結晶学的構造の知識を用い、そしてインターフェロニン- $\beta-1a$ -ポリマー結合体を開発した。ここで、このポリマーは、結合体が、結合体化していないインターフェロニン- $\beta-1a$ と比較し

て、インターフェロン β -1 a の十分な活性を保持することを可能にするインターフェロン β -1 a の部位に連結されている。

【0009】

本発明の1つの局面は、結合体化インターフェロン β -1 a 複合体であり、ここでこのインターフェロン β -1 a は、ポリアルキレングリコールをその不可欠部分として組み込む、ポリマーに共有結合されている。

【0010】

1つの特定の局面において、本発明は、ポリアルキレングリコール部分を含むポリマーと連結された生理学的に活性なインターフェロン β -1 a を含む、生理学的に活性なインターフェロン β -1 a 組成物に関する。ここで、この組成物中の生理学的に活性なインターフェロン β -1 a が、インターフェロン β -1 a 単独（すなわち、それらに連結されるポリマーが欠けている、非結合体化形態）と比較して増強した半減期を有するように、このインターフェロン β -1 a およびポリアルキレングリコール部分が配置されている。

【0011】

本発明の別の局面は、ポリマーと連結された生理学的に活性なインターフェロン β -1 a を含む、インターフェロン β -1 a 組成物である。ここで、このインターフェロン β -1 a は、融合タンパク質（好ましくは、免疫グロブリン融合物）である。このような複合体において、N末端の最も近位（ポリマーとの結合体化部位）およびC末端（I g 部分との融合部位）は、ポリマー結合体化が、この融合タンパク質の免疫原性を低減し得ることを示唆する。

【0012】

別の局面において、本発明は、ポリアルキレングリコール部分を含むポリマーと連結された生理学的に活性なインターフェロン β -1 a を含む、生理学的に活性なインターフェロン β -1 a 組成物に関する。ここで、この組成物中の生理学的に活性なインターフェロン β -1 a が、インターフェロン β -1 b 単独（すなわち、それらに連結されるポリマーが欠けている、非結合体化形態）と比較して増強した活性を有するように、このインターフェロン β -1 a およびポリアルキレングリコール部分が配置されている。

【0013】

本発明の別の実施形態は、結合体化したインターフェロン β -1aタンパク質である。結合体化したインターフェロン β -1aタンパク質のインターフェロン β -1a部分は、非変異形態のインターフェロン β -1aと比較して、選択的に増強した抗ウイルス活性および／または抗増殖活性を有するムテインを提供するように変異されている。

【0014】

本発明は、さらなる局面において、生理学的に適合性のポリエチレングリコール部分に共有結的に連結された、生理学的に活性なインターフェロン β -1aを含む、安定な水溶性の結合体化インターフェロン β -1a複合体に関する。このような複合体において、このインターフェロン β -1aは、不安定な共有結合により、このインターフェロン β -1aの遊離アミノ基 (amino acid group) でこの生理学的に適合性のポリエチレングリコール部分に共有結的に連結され得、ここでこの不安定な共有結合が、生化学的加水分解および／またはタンパク質分解によりインビボで切断される。

【0015】

別の局面において、本発明は、薬学的に受容可能なキャリア、および生理学的に適合性のポリエチレングリコールに連結されたインターフェロン β を含む、安定な水溶性のインターフェロン β -1a複合体を含有する、投薬形態に関する。

【0016】

別の局面において、例えば、上記のような共有結的に連結したインターフェロン β -1a組成物は、診断適用またはインビトロ適用に関して意図したインターフェロン β -1aを利用し得る。ここで、このインターフェロン β -1aは、例えば、イムノアッセイまたは他の診断適用または非インビボ適用のための診断試薬である。このような非治療的適用において、本発明の複合体は、例えば、適合性溶媒または他の溶液ベースの処方物に処方されて、分解に対して抵抗性が増強している安定な組成形態を提供し得る、安定化した組成物として非常に有用に使用され得る。

【0017】

非毒性ポリマーを用いたインターフェロン- β -1 a の改変は、特定の利点を提供しうる。産物（ポリマー-インターフェロン- β -1 a 結合体）がそれらの生物学的活性の全てまたは大部分を保持する方法で改変が行われる場合、以下の特性が生じ得る：増加した半減期および組織分布の改変（例えば、長期間にわたり血管系にとどまる能力）を導く、変化した薬物動態学および薬力学；溶液における安定性の増加；免疫原性の減少；タンパク質分解消化からの改変インターフェロン- β -1 a の保護；および活性のその後の消滅；経口使用または吸入使用のために散剤化したインターフェロン- β -1 a のより有効な処方物をもたらす、熱安定性の増加。

【0018】

上記のように改善した特性を付与したインターフェロン- β -1 a は、経口投与、エアロゾル投与、または非経口投与のいずれかに従う治療として有効であり得る。他の投与経路（例えば、経鼻および経皮）もまた、改変インターフェロン- β -1 a を用いて可能である。

【0019】

本発明の別の局面は、脈管形成および新生血管形成をを阻害する方法であり、この方法は、本発明の組成物の有効量を被験体に投与する工程を包含する。血管系におけるインターフェロンのレベルおよび持続時間の増加の結果として、本発明のPEG化産物は、脈管形成インヒビターとして特に有効であるはずである。

【0020】

非治療（例えば、診断）適用において、インターフェロン β の診断種および/または試薬種の結合体化もまた、企図される。得られた結合体化薬剤は、環境的分解性因子（溶媒媒介性分解プロセスまたは溶液媒介性分解プロセスを含む）に抵抗性である。インターフェロン- β -1 a のこのような増強した抵抗性および増加した安定性の結果として、活性成分の安定性は、用いられる特定の最終用途（end use）におけるインターフェロン- β -1 a 含有組成物の付随する信頼性とともに、有意に増加し得る。

【0021】

本発明の他の局面、特徴、および改変物は、以下の開示および添付の特許請求の範囲からより完全に明らである。

【0022】

(発明の詳細な説明)

(定義)

本明細書中で使用される場合、用語「共有結合した(された)」とは、特定化された部分が、互いに直接的に共有結合されるか、または介在する部分(例えば、架橋、スペーサー、または連結部分)を通じて互いに間接的に共有結合されることを意味する。

【0023】

インターフェロン「インターフェロン」(「IFN」とも称される)は、ウイルス、ポリペプチド、マイトジェンなどのような種々のインデューサーへの曝露にตอบสนองして、哺乳動物細胞によって産生される、小さな種特異的な単鎖ポリペプチドである。本発明で使用する最も好ましいインターフェロンは、グリコシル化されたヒトインターフェロン β であり、これは残基80(Asn80)でグリコシル化され、そして好ましくは、組換えDNA技術を用いて誘導される。この好ましいグリコシル化されたインターフェロン β は、「インターフェロンペプター1a」または「INFペプター1a」または「IFN β -1a」または「インターフェロンペプター1a」または「インターフェロン β -1a」と呼ばれ、これらは全て、交換可能に使用される。用語「INFペプター1a」はまた、その変異体もまた、残基80(Asn80)でグリコシル化される場合、このような変異体を包含することを意味する(例えば、実施例1)。タンパク質(インターフェロンを含む)を産生するための組換えDNA方法は、公知である。例えば、米国特許第4,399,216号、同第5,149,636号、同第5,179,017号(Axel)および同第4,470,461号(Kaufman)を参照のこと。

【0024】

本発明の方法において使用され得る好ましいインターフェロン β -1aポリヌクレオチドは、様々な脊椎動物(好ましくは、哺乳動物)の野生型インター

エロンβ遺伝子配列に由来し、そして以下の米国特許において記載されるような、当業者に周知の方法を使用して得られる：米国特許第5,641,656(1997年6月24日発行：DNA encoding avian type I interferon proprotein and mature avian type I interferon)、米国特許第5,605,688号(1997年2月25日：recombinant dog and horse type I interferons)；米国特許第5,231,176号(1993年7月27日、DNA molecule encoding a human leukocyte interferon)；米国特許第5,071,761号(1991年12月10日、DNA sequence coding for sub-sequences of human lymphoblastoid interferons LyIFN-α-2 and LyIFN-α-3)；米国特許第4,970,161号(1990年11月13日、DNA sequence coding for human interferon-γ)；米国特許第4,738,931号(1988年4月19日、DNA containing a human interferon β gene)；米国特許第4,695,543号(1987年9月22日、human α-interferon Gx-1 gene)および米国特許第4,456,748号(1984年6月26日、DNA encoding sub-sequences of different, naturally, occurring leukocyte interferons)。

【0025】

インターフェロンβ-1aの変異体は、本発明に従って使用され得る。変異体は、当業者に公知の、特異的変異誘発の従来の方法を使用して発生される。さらに、本発明は、機能的に等価なインターフェロンβ-1aポリペプチドをコードする機能的に等価なインターフェロンβ-1aポリヌクレオチドを提供する。

【0026】

インターフェロン- β -1 a をコードする第1のポリヌクレオチドは、それが、以下の条件の少なくとも1つを満たす場合、インターフェロン- β -1 a をコードする第2のポリヌクレオチドと比較して、「機能的に等価」である：

(a) 「機能的等価物」が、標準的なハイブリダイゼーション条件下で第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズし、そして/または第1のポリヌクレオチド配列へと縮重される、第1のポリヌクレオチドである。より好ましくは、それは、インターフェロン- β -1 a の活性を有する変異体インターフェロンをコードする；

(b) 「機能的等価物」が、第2のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列についての発現をコードする第1のポリヌクレオチドである。

【0027】

要約すると、用語「インターフェロン」は、上記に列挙された薬剤ならびにそれらの機能的等価物を含むが、これらに限定されない。それゆえ、本明細書中で使用される場合、用語「機能的等価物」とは、そのインターフェロンが機能的等価物とみなされるようび、哺乳動物レシビエントに対する同じかもしくは改良された有益な効果を有するインターフェロン- β -1 a タンパク質、またはそのインターフェロン- β -1 a タンパク質をコードするポリヌクレオチドをいう。当業者に明らかなように、機能的に等価なタンパク質は、組換え技術によって、例えば、「機能的に等価なDNA」を発現することによって、産生され得る。従って、本発明は、天然に存在するDNAによってコードされるインターフェロン- β -1 a タンパク質、ならびに天然に存在するDNAによってコードされるのと同じタンパク質をコードする天然には存在しないDNAによってコードされるインターフェロン- β -1 a を包含する。配列をコードするヌクレオチドの縮重に起因して、他のポリヌクレオチドは、インターフェロン- β -1 a をコードするために使用され得る。これらは、配列内の同じアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変更され、従ってサイレント変化が産生される、上記の配列の全てまたは部分を含む。このような変更された配列は、これらの配列の等価物とみなす。例えば、Phe (F) は、2つのコドン (TTCまたはTTT) によってコードされ、Tyr (Y) は、TACまたはTATによってコードされ、

そしてHis (H) は、CACまたはCATによってコードされる。反対に、Trp (W) は、単一のコドンTGGによってコードされる。従って、特定のインターフェロンをコードする所定のDNA配列について、それをコードする多くのDNA縮重配列が存在することが理解される。これらの縮重DNA配列は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0028】

「融合」とは、それらの個々のペプチド骨格を介する、それらのタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子の遺伝子発現を通じての、2つ以上のタンパク質またはそのフラグメントの共線状連結 (co-linear linkage) をいう。タンパク質またはそのフラグメントが異なる供給源に由来することが好ましい。従って、好ましい融合タンパク質は、インターフェロンではない第2の部分に共有結合されたインターフェロン- β -1aのタンパク質またはフラグメントを含む。詳細には、「インターフェロン- β -1a/Ig融合」は、免疫グロブリン鎖のN末端に連結された本発明のインターフェロン- β -1a分子またはそのフラグメントを含むタンパク質であり、ここで免疫グロブリンのN末端の部分は、インターフェロン- β -1aと置換される。

【0029】

「組換え」とは、本明細書中で使用される場合、タンパク質が、組換え哺乳動物発現系から誘導されることを意味する。ほとんどの細菌培養 (例えば、E. coli) において発現されるタンパク質は、グリカンを含まないで、これらの発現系は好ましくない。酵母において発現されるタンパク質は、哺乳動物細胞によって発現されるものとは異なるオリゴサッカリド構造を有し得る。

【0030】

「生物学的に活性」とは、インターフェロン- β -1aの特徴として本明細書を通じて使用される場合、特定の分子が、実施例1 (以下を参照こと) に示される型のインビトロ抗ウイルスアッセイにおいて測定されるような抗ウイルス活性を可能にするに十分な、本明細書中に開示される本発明の形態とのアミノ酸配列相同性を共有することを意味する。

【0031】

「治療用組成物」とは、本明細書中で使用される場合、本発明のタンパク質および他の生理学的に適合可能な成分を含む、として規定される。治療用組成物は、賦形剤（例えば、水、ミネラル、およびタンパク質のようなキャリア）を含み得る。

【0032】

本発明の薬剤の「有効量」とは、処置される特定の状態に対して結果を産生するか、またはそれに対する影響を発揮する量である。

【0033】

「アミノ酸」—ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質のモノマー単位。天然に存在するペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質に見出される20のアミノ酸が存在し、それらの全ては、L型異性体である。この用語はまた、これらのアミノ酸のアナログならびにこれらのタンパク質アミノ酸のD型異性体およびそのアナログを含む。

【0034】

「誘導体化」アミノ酸は、天然または非天然アミノ酸であり、ここでは、通常存在する側鎖または末端基が、化学反応によって改変される。このような改変としては、例えば、以下が挙げられる：γ-カルボキシル化、β-カルボキシル化、硫酸化、スルホン化、リン酸化、アミド化、エステル化、N-アセチル化、カルボベンジル化（carbobenzylation）、トシル化、および当該分野で公知の他の改変。「誘導体化ポリペプチド」は、1つ以上の誘導体化アミノ酸を含むポリペプチドである。

【0035】

「タンパク質」—本質的に20のアミノ酸のいずれかからなる任意のポリマー。「ポリペプチド」は、しばしば、比較的大きいポリペプチドに関して使用されるが、「ペプチド」は、しばしば小ポリペプチドに関して使用され、当該分野におけるこれらの用語の使用頻度は重複し、そして変動する。用語「タンパク質」とは、本明細書中で使用される場合、他に注記されなければ、ペプチド、タンパク質およびポリペプチドをいう。

【0036】

「変異体」－生物の遺伝物質における任意の変化、特に、野生型ポリヌクレオチド配列における任意の変化（すなわち、欠失、置換、付加または改変）または野生型タンパク質における任意の変化。用語「ムテイン」は、「変異体」と交換可能に使用される。

【0037】

「野生型」－通常にはインビボで存在するような、天然に存在する、それぞれ、タンパク質のエキシンのポリヌクレオチド配列もしくはその部分、またはタンパク質配列もしくはその部分。

【0038】

「標準的なハイブリダイゼーション条件」－ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、 $0.5 \times \text{SSC}$ ～ 約 $5 \times \text{SSC}$ および 65°C に実質的に等価な塩および温度条件。従って、本明細書中で使用される場合、用語「標準的なハイブリダイゼーション条件」は、操作の規定であり、そしてハイブリダイゼーション条件の一定範囲を包含する。より高いストリンジェンシーは、例えば、ブラスクリーン緩衝液（ 0.2% ポリビニルピロリドン、 0.2% Ficoll 400； 0.2% ウシ血清アルブミン、 50mM Tris-HCl（ $\text{pH} 7.5$ ）； 1M NaCl； 0.1% リン酸ナトリウム； 1% SDS）； 10% 硫酸デキストラン、および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性超音波処理サケ精子DNAを用いた 65°C で $12 \sim 20$ 時間のハイブリダイゼーション工程、ならびに 75mM NaCl / 7.5mM クエン酸ナトリウム（ $0.5 \times \text{SSC}$ ） / 1% SDSを用いた 65°C での洗浄工程を含み得る。より低いストリンジェンシー条件は、例えば、ブラスクリーン緩衝液、 10% 硫酸デキストランおよび $110\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性超音波処理サケ精子DNAを用いた 55°C で $12 \sim 20$ 時間のハイブリダイゼーション工程、ならびに 300mM NaCl / 30mM クエン酸ナトリウム（ $2 \times \text{SSC}$ ） / 1% SDSを用いた 55°C での洗浄工程を含み得る。Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, 第6.3.1～6.3.6節（1989）もまた参照のこと。

【0039】

「発現制御配列」一遺伝子に作動可能に連結された場合にそれらの遺伝子の発現を制御および調節するポリヌクレオチド配列。

【0040】

「作動可能に連結される(た)」一ポリヌクレオチド配列(DNA、RNA)は、発現制御配列に作動可能に連結され、その発現制御配列がポリヌクレオチド配列の転写および翻訳を制御および調節する。用語「作動可能に連結される(た)」は、発現されるポリヌクレオチド配列の前に適切な開始シグナル(例えば、ATG)を有し、発現制御配列の制御下でのこのポリヌクレオチド配列の発現、およびこのポリヌクレオチド配列によってコードされる所望のポリペプチドの生成を可能にするように正しいオープンリーディングフレームを維持することを含む。

【0041】

「発現ベクター」一発現ベクターが宿主細胞に導入される場合に、少なくとも1つの遺伝子の発現を可能にする(他の一般的な例の中でも)ポリヌクレオチド(例えば、DNAプラスミドまたはファージ)。このベクターは、細胞中で複製されてもよいし、複製されなくてもよい。

【0042】

「単離される(た)」(「実質的に純粋」と交換可能に使用される)一ポリペプチドをコードする核酸(すなわち、ポリヌクレオチド配列)に適用される場合には、RNAまたはDNAポリヌクレオチド、ゲノムポリヌクレオチドの一部、cDNAまたは合成ポリヌクレオチドを意味する。これらは、その起源または操作により：(i)天然で結合している全てのポリヌクレオチドと結合していない(例えば、発現ベクターとして宿主細胞に存在するポリヌクレオチドまたはその一部)；または(ii)天然に連結している以外の、核酸または他の化学的部分に連結している；または(iii)天然に存在しない。「単離される(た)」によって、(i)例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりインビトロで増幅される；(ii)化学合成される；(iii)クローニングにより組換え生成される；または(iv)切断およびゲル分離により精製される、ポリヌクレオチド配列がさらに意味される。

【0043】

従って、「実質的に純粋な核酸」は、核酸が由来している生物の天然に存在するゲノムにおいて通常は連続しているコード配列の一方または両方とはすぐに連続していない核酸である。実質的に純粋なDNAはまた、さらなる配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAを含む。

【0044】

「単離される(た)」(「実質的に純粋」と交換可能に使用される)一ポリペプチドに対して適用される場合には、ポリペプチドまたはその一部を意味し、これらは、その起源または操作により：(i)発現ベクターの一部の発現産物として宿主細胞に存在する；または(ii)天然に連結している以外の、タンパク質または他の化学的部分と連結している；または(iii)天然に存在しない。「単離される(た)」によって、(i)化学合成される；または(ii)宿主細胞において発現され、そして関連するタンパク質から精製される、タンパク質および核酸がさらに意味される。この用語は、一般には、天然で共に存在する他のタンパク質から分離しているポリペプチドを意味する。好ましくは、このポリペプチドはまた、精製するために使用される抗体またはゲルマトリクス(ポリアクリルアミド)のような物質から分離される。

【0045】

「異位プロモーター」一本明細書中で使用される場合は、遺伝子または精製された核酸と天然には結合しないプロモーターである。

【0046】

「相同(な)」一本明細書中で使用される場合は、用語「同一」と類似であり、そして2つのポリペプチド分子間または2つの核酸間の配列類似性をいう。2つの比較される配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸ヌクレオチドにより占有される場合(例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンにより占有されるか、または2つのポリペプチドの各々における位置がリジンにより占有される場合)、それぞれの分子は、その位置で相同である。2つの配列間の相同性パーセントは、2つの配列により共有される適合位置または相同な位置の数を比較された位置の数で割って100をかけた関数である。例えば、

2つの配列間で10個の位置のうち6個が適合または相同である場合、2つの配列は60%相同である。例を挙げると、DNA配列CTGACTおよびCAGGTは、50%の相同性を共有する(計6個の位置のうち3個が適合している)。一般に、2つの配列が整列されて、最大の相同性が与えられた場合、比較が行われる。このような整列は、例えば、Needlemanら、J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)の方法を用いて提供され得、Alignプログラム(DNAstar, Inc.)のようなコンピュータプログラムにより簡便に実行され得る。相同な配列は、同一または類似のアミノ酸残基を共有し、ここで、類似の残基は、整列された参照配列における対応するアミノ酸残基の保存的置換または「許容される点変異」である。これに関して、参照配列における残基の「保存的置換」は、共有結合または水素結合を形成する能力などを含む、対応する参照残基に物理的または機能的に類似する(例えば、類似のサイズ、形状、電荷、化学的特性を有する)それらの置換である。特に好ましい保存的置換は、Dayhoffら、5:Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:補遺3, 第22章:354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D. C. (1978)における「受容される点変異」について規定される基準を満たすものである。

【0047】

用語「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」はまた、本明細書中で交換可能に使用される。

【0048】

用語「脈管形成」および「新生血管形成」は、それらの最も広い意味において、新たな血管の増加を意味する。特に、「脈管形成」はまた、腫瘍部位での新たな血管の増加をいう。

【0049】

「IFNAR2」、「IFNAR1」、「IFNAR1/2」とは、細胞表面1型インターフェロンレセプターを含むことが公知のタンパク質をいう。IFNAR2鎖の細胞外部分(外部ドメイン)は、単独で、インターフェロン α または

インターフェロン β を結合し得る。

【0050】

本発明の実施は、他に示されない限り、当業者の範囲内の、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、微生物学、組換えDNA、タンパク質化学、および免疫学の従来の技術を使用する。このような技術は、文献に記載される。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 (Sambrook, FritschおよびManiatis編) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, 第I巻および第II巻 (D. N. Glover編) 1985; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編) 1984; 米国特許第4, 683, 195号 (Mullisら); Nucleic Acid Hybridization (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編) 1984; Transcription and Translation (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編) 1984; Culture of Animal Cells (R. I. Freshney編) Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal) 1984; Methods in Enzymology, 第154巻および第155巻 (Wuら編) Academic Press New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. MillerおよびM. P. Calos編) 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (MayerおよびWalker編), Academic Press London, 1987; Handbook of Experimental Immunology, 第I~IV巻 (D. M. WeirおよびBlacjwell編) 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbo

【0051】

(インターフェロン- β)

インターフェロン- β -1aは、疾患状態、生理学的状態、症状または病因因子の処置、寛解または減弱、あるいはこれらの評価または診断のための薬剤として有用である。この用語はまた、それ自身が、融合タンパク質（例えば、免疫グロブリン-インターフェロン- β -1a融合タンパク質（同時係属出願番号60/104,572および同60/120,161に記載されるような）の部分である、インターフェロン- β -1aをいう。融合タンパク質の調製は、一般的に、当業者の周知である。

【0052】

本発明者らは、インターフェロン- β -1aの機能を破壊しないポリマー結合のための固有の部位を見出した。さらに、本発明者らはまた、ポリマー結合のための部位を独立して調べるための部位特異的変異誘発法を使用した（実施例1を参照のこと）。手短に言えば、本発明者らは、活性およびレセプター結合に必要なとされる残基のマッピングを目指して、ヒトインターフェロン- β -1aの変異分析を行った。インターフェロン- β -1aの3D結晶構造の入手可能性（上記および実施例1を参照のこと）は、本発明者らが、アラニン（または、セリン）置換のための、インターフェロン β レセプター相互作用に利用可能な、溶媒に露出される残基を同定し、そして分子内結合に關与するアミノ酸を保持することを可能にする。インターフェロン- β -1aのヘリックス（A、B、C、D、E）およびループ（AB1、AB2、AB3、CD1、CD2、DE1、DE2）の各々が、異なる領域に沿って2〜8残基間で置換される、15のアラニンスキャニング変異のパネルを設計した。実施例1を参照のこと。

【0053】

哺乳動物細胞で発現された変異体（図10およびcDNAおよび推定アミノ酸配列について、それぞれ配列番号（SEQ ID NO:）1および配列番号2）のアフィニティー精製のために、アミノ末端ヒスチンタグ（「his」タグ）を含んだ。これらの変異体の機能的コンセンサスを、抗ウイルスアッセイおよ

び抗増殖アッセイにおいて評価する。非放射活性結合アッセイを開発し、これらの変異体をインターフェロン β 表面細胞レセプター（IFNAR1／2細胞表面レセプター）へのそれらの結合について分析した。さらに、IFNAR2-エクストドメイン／I β 融合タンパク質を使用してインターフェロンを結合する、ELISAベースのアッセイを使用して、インターフェロン β -1aとIFNAR2との間の表面の相互作用をマッピングした（実施例1を参照のこと）。これらの変異分析は、N末端およびC末端が、レセプター結合または生物学的機能に重要でないインターフェロン β 分子の部分に位置することを実証した。

【0054】

これらの変異体は、本発明のインターフェロン β -1a部分のさらなる改変体であり、これは、野生型のインターフェロン β -1aに見出されない新規な特性を示すので、特に有用であり得る（実施例1を参照のこと）。本発明者らは、標的化された変異誘発によって引き起こされる3つの型の効果を同定した。これらの効果は、特定の状況下でのインターフェロン薬物開発に有利であり得る。これらの3つの型の効果は、以下のとおりである：（a）his-野生型インターフェロン β -1aの抗ウイルス活性より高い抗ウイルス活性を有する変異体（例えば、変異体C1）；（b）his-野生型インターフェロン β -1aと比較して、抗ウイルスアッセイおよび抗増殖性アッセイの両方において活性を提示するが、その抗増殖活性は、抗ウイルス活性に対して不適合に低い、変異体（例えば、変異体C1、DおよびDE1）；および（c）his-野生型インターフェロン β -1aと比較して、レセプター結合に対して不適合に低い、抗ウイルス活性および抗増殖性活性を示す、機能的アンタゴニスト（例えば、A1、B2、CD2およびDE1）。

【0055】

（ポリマー部分）

本発明の広い範囲内において、単一のポリマー分子が、インターフェロン β -1aとの結合体化に使用され得るが、1より多いポリマー分子も同様に結合され得ることもまた意図される。本発明の結合体化インターフェロン β -1a組成物は、インビボおよびインビボ適用の両方において、有用性を見出し得る。

さらに、この結合体化ポリマーは、目的用途適用に適切な、任意の他の基、部分、または他の結合体化される種を利用し得る。例として、ポリマーに、そのポリマーに対してUV分解耐性、または抗酸化、あるいは他の特性または特徴を付与する、機能性部分を共有結合させることが、いくつかの適用において有用であり得る。さらなる例として、ポリマーを官能基化して、そのポリマーを反応性または架橋可能な性質にするか、結合体化物質全体の種々の特性または特徴を増強することが、いくつかの適用において有利であり得る。従って、ポリマーは、その意図される目的のための結合体化インターフェロン- β -1 a 組成物の効力を妨げない、任意の官能基、反復基、連結または他の構成構造を含み得る。本発明の他の目的および利点は、以下の開示および添付の特許請求の範囲からより完全に明らかである。

【0056】

これらの所望の特徴を達成するために有用に使用され得る例示的ポリマーは、例示的反応スキームにおいて、本明細書中以下に記載される。共有結合されたペプチドの適用において、このポリマーは官能化され得、次いで、このペプチドの遊離アミノ酸に結合され、不安定な結合を形成する。

【0057】

インターフェロン- β -1 a は、最も好ましくは、ポリマー上の末端反応基を介して、結合体化されるが、結合体化はまた、非末端反応基からの分枝され得る。この反応基を有するポリマーは、本明細書中「活性化ポリマー」として命名される。この反応基は、タンパク質上の遊離アミノ基または他の反応基と選択的に反応する。この活性化ポリマーは、結合が、インターフェロン- β -1 a の任意の利用可能なアミノ基（例えば、リジンの α アミノ基または ϵ アミノ基）で生じ得るように、反応される。インターフェロン- β -1 a の遊離のカルボキシル基、適切に活性化されたカルボニル基、ヒドロキシル基、グアニジル基、酸化された糖鎖部分およびメルカプト基（これらが、利用可能である場合）もまた、結合部位として使用され得る。

【0058】

ポリマーは、インターフェロン- β -1 a 分子上の任意の位置で結合され得る

が、ポリマー結合の最も好ましい部位は、インターフェロン β -1 a のN末端である。第2の部位は、C末端またはC末端近辺であり、かつ糖部分を介する。従って、本発明は、その最も好ましい実施形態として、以下を意図する：(i) インターフェロン β -1 a のN末端結合型ポリマー結合体；(i i) インターフェロン β -1 a のC末端結合型ポリマー結合体；(i i i) ポリマー結合体の糖結合型結合体；ならびに(i v) インターフェロン β -1 a 融合タンパク質のN末端結合型ポリマー結合体、C末端結合型ポリマー結合体および糖結合型ポリマー結合体。

【0059】

タンパク質濃度に依存して、一般にタンパク質1モルあたり約1、0～約10モルの活性化ポリマーが、使用される。最終量は、その産物の非特異的改変を最小化しながら、この反応の程度を最大化することと、同時に、可能な場合にそのタンパク質の半減期を同時に最適化しながら、最適活性を維持する化学を規定することとの間の平衡である。好ましくは、このタンパク質の生物学的活性の少なくとも約50%が維持され、最も好ましくは、100%が維持される。

【0060】

この反応は、この反応基がN末端の α アミノ基上にある場合、生物学的に活性な物質を不活性ポリマーと反応させる（好ましくは、約pH5～7で）ために使用される、任意の適切な方法によって生じ得る。一般的に、このプロセスは、活性化ポリマー（これは、少なくとも1つの末端ヒドロキシル基を有し得る）を調製する工程、およびその後、タンパク質をこの活性化ポリマーと反応させて、処方に適切な可溶性タンパク質を生成する工程を包含する。上記の改変反応は、1以上の工程を含み得る、いくつかの方法によって行われ得る。

【0061】

上記のように、本発明の最も好ましい実施形態は、インターフェロン β -1 a のN末端を、ポリマーへの結合として利用する。適切な方法は、N末端改変型インターフェロン β -1 a を選択的に得るために利用可能である。1つの方法は、還元的アルキル化方法によって例示され、これは、インターフェロン β -1 a に対する誘導体化に利用可能な、異なる型の一級アミノ基の差示的な反応性

(リジン上のεアミノ基 対 N末端メチオニン上のアミノ基)を利用する。適切な選択条件下で、インターフェロン-β-1 aのそのN末端でのカルボニル基含有ポリマーでの実質的に選択的な誘導体化が、達成され得る。この反応は、インターフェロン-β-1 aのリジン残基のεアミノ基とN末端残基のαアミノ基との間のpKaの差異の利用を可能にさせるpHで行われる。この型の化学は、当業者に周知である。

【0062】

本発明者らは、この選択性が、PEG-アルデヒドポリマーを、シアノ水素化ホウ素ナトリウムの存在下でインターフェロン-β-1 aと反応させる条件下で、低pH(一般的に、5~6)で反応を行うことによって維持される反応スキームを利用した。この結果は、PEG-インターフェロン-β-1 aの精製ならびにSDS-PAGE、MALDI質量分析法およびペプチド配列決定/マッピングでの分析後に、そのN末端が、PEG部分によって特異的に標的化されるインターフェロン-β-1 aを生じた。

【0063】

インターフェロン-β-1 aの結晶構造は、そのN末端およびC末端が、互いに近接に位置するような状態である(Karpusasら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. 94:11813-11818を参照のこと)。従って、インターフェロン-β-1 aのC末端の改変もまた、活性に対する最小の効果を有するはずである。ポリアルキレングリコールポリマー(例えば、PEG)をC末端に標的化するための単純な化学ストラテジーは存在しないが、そのポリマー部分を標的化するために使用され得る部位を遺伝子操作することは容易である。例えば、C末端またはC末端近辺にある部位でのCysの組み込みは、マレイミド、ビニルスルホンまたはハロアセテートで活性化した、ポリアルキレングリコール(例えば、PEG)を使用する、特異的改変を可能にする。これらの誘導体は、これらの試薬のCysに対する高度な選択性に起因して、この操作されたシステインの改変に特異的に使用され得る。他のストラテジー(例えば、標的化され得るヒスチジンタグの組み込み(Fancyら(1996)Chem. & Biol. 3:551)またはさらなるグリコシル化部位の組み込み)

は、インターフェロン-β-1 a のC末端を改変するための他の代替法を提示する。

【0064】

インターフェロン-β-1 a 上のグリカンもまた、活性を変化させることなく、さらなる改変を可能にする位置に存在する。化学的改変のための部位として糖を標的化するための方法もまた周知であり、従って、ポリアルキレングリコールポリマーは、酸化によって活性化されたインターフェロン-β-1 a 上の糖に、直接的かつ特異的に付加され得るようである。例えば、アルデヒドおよびケトンとの縮合による比較的安定なヒドラゾン結合を形成する、ポリエチレングリコール-ヒドラジドヒドラジドが生成され得る。この特性は、酸化オリゴサッカリド結合を介するタンパク質の改変に使用されている。Andresz, H. ら (1978)、*Makromol. Chem.* 179:301を参照のこと。特に、PEG-カルボキシメチルヒドラジドの亜硝酸塩での処理は、アミノ基に対して反応性の求電子活性基である、PEG-カルボキシメチルアジドを生成する。この反応は、ポリアルキレングリコール改変型タンパク質を調製するために同様に使用され得る。米国特許第4,101,380号および同第4,179,337号を参照のこと。

【0065】

本発明者らは、チオールリンカー媒介化学が、タンパク質の架橋をさらに容易にし得ることを、以前に発見した。特に、本発明者らは、過ヨウ素酸ナトリウムでの炭水化物部分上の反応性アルデヒドの生成、このアルデヒドを介するシスタミン結合体の形成およびこのシスタミン上のチオール基を介する架橋の誘導のような手段を使用して、LFA-3およびCD4のホモタイプマルチマーを生成した。Pepinsky, B. ら (1991) *J. Biol. Chem.*, 266:18244-18249およびChen, L. L. ら (1991) *J. Biol. Chem.*, 266:18237-18243を参照のこと。従って、本発明者らは、この型の化学がまた、リンカーが糖に組み込まれ、そしてポリアルキレングリコールポリマーがそのリンカーに結合される、ポリアルキレングリコールポリマーでの改変に適切であると考えた。アミノチオールまたはヒドラジンを

含有リンカーは、単一のポリマー基の付加を可能にする一方で、複数のポリマーが付加されるように、そして/またはインターフェロシー $\beta-1a$ に対するそのポリマーの空間的配向を変化させるように、このリンカー構造が、改変され得る。

【0066】

本発明の実施において、C1～C4のアルキルポリアルキレングリコールのポリアルキレングリコール残基（好ましくは、ポリエチレングリコール（PEG））またはこのようなグリコールのポリ（オキシ）アルキレングリコール残基は、目的のポリマー系に有利に組み込まれる。従って、タンパク質が結合されるポリマーは、全ての場合において、このポリマーが室温の水中で可溶性であるという条件でポリエチレングリコール（PEG）のホモポリマーであり得るか、またはポリオキシエチル化ポリオールである。このようなポリマーの非限定的な例としては、ポリアルキレンオキシドホモポリマー（例えば、PEGまたはポリプロピレングリコール）、ポリオキシエチレン化グリコール、それらのそれらのコポリマーおよびそれらのブロックコポリマー（このブロックコポリマーの水溶性が維持される場合）が挙げられる。ポリオキシエチル化ポリオールの例としては、例えば、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グリセロールなどが挙げられる。ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格は、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドの、例えば、動物およびヒトにおいて天然に存在する同じ骨格である。従って、この分枝化は、体内において外来因子として必ずしもみなされない。

【0067】

ポリアルキレンオキシドの代替物として、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、炭水化物ベースのポリマーなどが使用され得る。当業者は、前述のリストが、単なる例示であり、そして本明細書中に記載される性質を有する全てのポリマー材料が意図されることを認識する。

【0068】

ポリマーは、任意の特定の分子量を有する必要はないが、分子量は、約300

～100,000、より好ましくは、10,000～40,000であることが好ましい。特に、20,000以上のサイズが、腎臓における濾過に起因するタンパク質の損失の防止において最適である。

【0069】

ポリアルキレングリコール誘導体化は、以下のポリアルキレングリコール誘導体の特性に関連するような、本発明の実施におけるポリマー-インターフェロン- β -1a 結合体の処方物において多くの有利な特性を有する：水溶性の改善（それと同時に抗原性または免疫原性応答を全く誘発しない）；高度な生体適合性；ポリアルキレングリコール誘導体のインビボ生分解性の非存在；および生存生物による排出の容易性。

【0070】

さらに、本発明の別の局面において、ポリマー成分に共有結合されたインターフェロン- β -1a が利用され得、ここで、この結合体の性質として、切断可能な共有化学結合が挙げられる。これは、ポリマーがインターフェロン- β -1a から切断され得る時間経過を考慮した制御を可能にする。インターフェロン- β -1a 薬物とポリマーとの間のこの共有結合は、化学反応または酵素反応によって切断され得る。ポリマー-インターフェロン- β -1a 産物は、受容可能な量の活性を保持する。同時に、ポリエチレングリコール部分が、この結合体化ポリマー中に存在し、このポリマー-インターフェロン- β -1a 結合体に、高い水溶性および長期の血液循環能力を与える。これらの改善された特徴の結果として、本発明は、インビボ適用における、活性なポリマー-インターフェロン- β -1a 種および加水分解切断後の、バイオアベイラビリティのインターフェロン- β -1a 自体の非経口送達、鼻内送達および経口送達、の両方を意図する。

【0071】

本明細書中に記載される反応スキームは、例えば、非経口および経口投与のための可溶性、安定性および細胞膜親和性を達成するためにインターフェロン- β -1a の改変において使用され得る反応および構造に関して、例示目的のみに提供され、限定されないことが理解されるべきである。最も好ましいN末端結合体化産物を得るための、ポリマーのインターフェロン- β -1a との反応は、広範

な種の反応スキームを使用して容易に行われる。インターフェロン- β -1 a 結合体の活性および安定性は、異なる分子サイズのポリマーを使用することによって、いくつかの方法において変更され得る。この結合体の可溶性は、ポリマー組成物に組み込まれるポリエチレングリコールフラグメントの割合およびサイズを変化させることによって、変更され得る。

【0072】

(有用性)

本発明の治療適用のために価値のあるポリアルキレングリコール誘導ポリマーの固有の特性は、その一般的な生体適合性である。ポリマーは、種々の水溶性特性を有し、そして毒性ではない。これらは、非免疫原性および非抗原性であると考えられ、そして本明細書中に記載の条件下で結合体化される場合に、インターフェロン- β -1 a 部分の生物学的活性を干渉しない。これらは、血中での長期の循環を有し、そして生体から容易に排出される。

【0073】

本発明の産物は、治療的インターフェロン- β -1 a の半減期を維持する際に有用であることが見出され、そして例えば、治療投与のために、水または受容可能な液体媒体中に溶解させることによって調製され得る。投与は、非経口経路、エアロゾル経路、または経口経路のいずれかによる。微細なコロイド懸濁液が、デボー効果を生じるように非経口投与または経口経路によるために調製され得るが、エアロゾル処方物は、本質的に液体または乾燥粉末であり得る。乾燥の、凍結乾燥状態または液体処方物において、本発明のインターフェロン- β -1 a ポリマー結合体は、良好な貯蔵安定性を有する。結合体化インターフェロン- β -1 a の熱安定性(実施例3)は、脱水工程を有する粉末処方プロセスにおいて有利である。例えば、PCT/US/95/06008 (「Methods and Compositions for Dry Powder of Interferons」)を参照のこと。

【0074】

本発明の治療ポリマー結合体は、インターフェロン- β -1 a 構成成分が有効である、任意の状況または疾患状態の予防または処置のために利用され得る。さ

らに、本発明のポリマーベースの結合体は、生物系または生物学的検体における構成、状況または疾患状態の診断において、ならびに非病理学系における診断目的において、利用され得る。

【0075】

治療的用法において、本発明は、このような状況または疾患状態を有するかまたは潜在的に感受性であり、このような処置が必要な動物被験体を処置する方法を意図し、この方法は、この状況または疾患状態に治療効果的である本発明のポリマー結合体の有効量を、このような動物に投与する工程を包含する。本発明のポリマー結合体によって処置されるべき被験体としては、哺乳動物被験体、そして最も好ましくはヒト被験体が挙げられる。開うべき特定の状況または疾患状態に依存して、動物被験体は、任意の適切な治療効果的かつ安全な投与量で、本発明のポリマー結合体を投与され得る。この用量は、当業者の能力の範囲内で、かつ過度の実験なく、容易に決定され得る。I型インターフェロンの種の開門のために、適切な種由来のインターフェロンを用いて、本明細書中に記載のようなインターフェロン-ポリマー結合体を生成することが必要であり得る。

【0076】

インターフェロン- β -1aの抗細胞増殖性活性は周知である。特に、本明細書中に記載の特定のインターフェロン- β -1aポリマー結合体は、腫瘍および癌（例えば、骨原性肉腫、リンパ腫、急性リンパ性白血病、乳癌、黒色腫および鼻咽頭癌）、ならびに自己免疫状態（例えば、線維症、狼瘡および多発性硬化症）の処置に有用である。これらの結合体化タンパク質（特に、本明細書中に記載の特定のインターフェロン- β -1aムテイン結合体）によって示される抗ウイルス活性は、ウイルス疾患（例えば、ECM感染、インフルエンザ、および他の気道感染、狂犬病、および肝炎）の処置に有用であり得る。本明細書中に記載される結合体化タンパク質によって示されるインターフェロン- β -1aの免疫調節活性は、自己免疫疾患および炎症性疾患（例えば、線維症、多発性硬化症）の処置に有用であり得ることもまた予期される。インターフェロンが、新しい血管の形成を阻害する（すなわち、脈管形成および新生血管形成を阻害する）能力は、本発明の結合体を、脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、

黄斑変性、角膜移植片拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルペオーシスおよびOssler-Weber症候群）を処置するために使用可能にする。

【0077】

さらに、インターフェロンの抗上皮活性は、かなりの間、知られており、インターフェロン作用の1つの潜在的機構は、腫瘍細胞によって生成された脈管形成因子の産生または効力を阻害することによって、内皮細胞活性を干渉することであり得る。いくつかの血管腫瘍（例えば、血管腫）は、インターフェロンでの処置に特に感受性である。インターフェロン- α での処置は、この疾患についての唯一の実証された処置である。本発明のインターフェロン- β -1 a 結合体での処置は、薬物動態および薬力学の点で実質的な薬学的利点を提供することが予期される。なぜなら、この結合体は、非結合体化インターフェロンより長時間、血管系中に維持され、従って、抗脈管形成剤としての使用のために、より効率的かつ効果的な治療をもたらすと予期されるからである。実施例8を参照のこと。

【0078】

本発明のポリマーインターフェロン- β -1 a 結合体は、それ自体で投与され得、そして薬学的に受容可能なエステル、塩およびその他の生理学的に機能的な誘導体の形態で投与され得る。このような薬学的および医薬処方物において、インターフェロン- β -1 a は好ましくは、1以上の薬学的に受容可能なキャリア、および必要に応じて、任意の他の治療成分と共に使用される。キャリアは、この処方物の他の成分と適合性であり、そしてそのレシピエントに過度に有害でないという意味において薬学的に受容可能でなければならない。インターフェロン- β -1 a は、上記のような所望の薬理学的効果を達成するのに有効な量、および所望の日用量を達成するのに適切な量で提供される。

【0079】

処方物としては、非経口投与および非経口でない（non-parenteral）投与に適切な処方物が挙げられ、そして特定の投与様式としては、経口、直腸、口腔（buccal）、局所的、鼻、眼、皮下、筋肉、静脈内、経皮、髄腔内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支、リンパ、髄、および子宮内への投与が挙げられる。経口投与、鼻投与および非経口投与に適切な処方物が、好ましい

。 【0080】

インターフェロン-β-1aは、液体溶液を含む処方物において利用される場合、この処方物は、経口または非経口的に、有利に投与され得る。インターフェロン-β-1aが、液体懸濁液処方物中で、または生体適合性キャリア処方物中の粉末として使用される場合、この処方物は、経口、直腸または気管支に、有利に投与され得る。

【0081】

インターフェロン-β-1aが散剂化固体の形態で直接使用される場合、インターフェロン-β-1aは、有利に経口的に投与され得る。あるいは、インターフェロン-β-1aは、キャリアガス中の散剂の噴霧を介して、経鼻的または経気管支的に投与されて、散剂のガス状の分散を形成し、これは、適切な噴霧デバイスを備える呼吸経路から患者によって吸入される。

【0082】

本発明のポリマー結合体を含む処方物は、単位用量形態で簡便に提供され得、そして薬学の技術分野において周知である方法のいずれかによって調製され得る。このような方法は、一般的に、活性成分に、1つ以上の補助成分を構成するキャリアを付随させる工程を包含する。代表的には、活性成分に、均一にかつ密接に、液体キャリア、微細に分裂させた固体キャリア、またはその両方を付随させること、次いで、必要な場合、生成物を所望の処方物の用量形態に形成することによって処方物を調製する。

【0083】

経口投与に適切な本発明の処方物は、カプセル剤、カシェ剤、錠剤、またはロゼンジのような個別の単位として提供され得、各々は、散剂もしくは顆粒；または水性溶液もしくは非水性溶液中の懸濁物（例えば、シロップ剤、エリキシル剤、懸濁液、または一回分（draught））として活性成分の所定の量を含む。

【0084】

錠剤は、必要に応じて、1つ以上の補助成分を用いて、圧縮または成形によっ

て作製され得る。圧縮された錠剤は、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、不活性希釈剤、界面活性剤、または被染剤とともに必要に応じて混合される散剤または顆粒のよう
な自由流動する形態にある活性化合物とともに、適切な機械中で圧縮される
ことによって調製され得る。適切なキャリアとの粉末ポリマー結合体の混合物か
らなる成形される錠剤は、適切な機械中で成形することによって作製され得る。

【0085】

シロップ剤は、濃縮された糖（例えば、ショ糖）の水溶液に活性化合物を添加
することによって作製され得、これにまた任意の補助成分を添加し得る。このよ
うな補助成分には、人工香料、適切な保存料、糖の結晶を保持するための薬剤
、および任意の他の成分の可溶性を増大させる薬剤（例えば、ポリヒドロキシア
ルコール（例えば、グリセロールまたはソルビトル））が含まれ得る。

【0086】

非経口投与のために適切な処方物は、簡便に、活性結合体の滅菌水性調製物を
含み、これは、好ましくは、レシビエントの血液と等張性である（例えば、生理
食塩水溶液）。このような処方物には、血液成分または1つ以上の器官に化合物
を標的化するために設計される、懸濁剤および濃厚剤または他の微粒子系が含ま
れ得る。その処方剤は、単位用量形態または複数用量形態で提供され得る。

【0087】

鼻用スプレー処方物は、保存剤および等張剤を有する活性結合体の精製された
水溶液を含む。このような処方物は、好ましくは、鼻の粘膜と適合可能な pH お
よび等張状態に調整される。

【0088】

直腸投与のための処方物は、適切なキャリア（例えば、ココアバター、水素化
脂肪、または水素化脂肪カルボン酸）を有する坐剤として提供され得る。

【0089】

眼の処方物（例えば、点眼剤）は、pH および等張性の因子が眼の pH および
等張性に好ましく適合する以外は、鼻用スプレーと同様の方法によって調製され
る。

【0090】

局所的処方物は、1つ以上の媒体（例えば、鉱油、石油、ポリヒドロキシアルコール、または局所的薬学的処方のために使用される他の基剤）中に可溶化されるかまたは懸濁される本発明の結合体を含む。

【0091】

上述の成分に加えて、本発明の処方物はさらに、希釈剤、緩衝剤、香味剤、崩壊剤、界面活性剤、濃厚剤、滑沢剤、保存剤（抗酸化剤を含む）などから選択される1つ以上の補助成分を含み得る。

【0092】

従って、本発明は、非治療的適用の好ましい例証的な適用として、溶液中でのインターフェロナーβ-1aのインビトロ安定化のための適切なポリマーの提供を意図する。そのポリマーは、例えば、インターフェロナーβ-1aの温度安定性および酵素分解耐性を増大するために利用され得る。本発明の様式における結合を介するインターフェロナーβ-1aに特徴的な温度安定性の増強は、保存期間の改善、室温安定性、ならびに研究用試薬およびキットの強固さの手段を提供する。

【0093】

以下の実施例は、本発明を例証するために提供され、そしてその限定としては解釈されるべきではない。特に、インビボで、本明細書中に記載された動物実験が変更され得、その結果、基本的な方法論の他の改変およびバリエーションが可能であることが理解される。例えば、実施例5において、当業者は、他のネオプテリンアッセイを使用し得るか、または使用される霊長類の数および種類を変更し得る。実施例に対するこれらの変更およびバリエーションは、本発明の意図および範囲にあると見なされる。

【0094】

（実施例1：アラニン/セリン置換変異を使用するヒトインターフェロナーβ-1aの構造/活性研究：レセプター結合部位および機能的ドメインの分析）

（A. 概観）

ヒトインターフェロナーβ-1a（INF-β-1a）の広範な変異分析を、活性およびレセプター結合に必要である残基のマッピングの目的で行った。ヒト

INF- β の3-D結晶構造 (Karpusas, M. ら、1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:11813-11818) の利用可能性は、本発明者らに、レセプター相互作用のために利用可能な、溶媒にさらされている残基である、アラニン (またはセリン) 置換を同定することおよび分子内結合に関与するアミノ酸を保持することを可能にした。各ヘリックス (A、B、C、D、E) およびループ (AB、CD、DE) の別個の領域に沿って2残基と8残基との間を置換する、15アラニン置換変異のパネルを設計した。アフィニティ精製のための6ヒスチジン残基を含むアミノ末端ヒスチンタグ、ならびにアミノ末端伸長の除去のためのエンテロキナーゼ切断部位を含めた。得られるインターフェロンは、「hisタグ化インターフェロン (INF) - β 」または「His-インターフェロン- β 」または「His₆-インターフェロン- β 」などといわれる。

【0095】

種々の変異体hisタグ化INF- β 発現プラスミドを、野生型INF- β 遺伝子構築物を変異誘発のための鋳型として使用して構築した。変異誘発ストラテジーは、野生型hisタグ化INF- β 遺伝子を通して独特な制限酵素切断部位を最初に導入する工程を包含し、次いでアラニン (またはセリン) 置換変異をコードする合成オリゴヌクレオチド二重鎖を用いて選択された制限酵素間で別個のDNA配列を置き換える工程を包含した。最後に、変異体INF遺伝子を、ヒト293腎臓細胞株中での哺乳動物細胞発現を指向するプラスミドにサブクローニングした。

【0096】

これらの変異の機能的な配列を、抗ウイルスアッセイおよび抗増殖アッセイにおいて評価した。非放射性INF結合アッセイを開発して、ヒトDauidバークトリンプ腫細胞の表面レセプター (「INFAR1/2複合体」) への結合においてこれらの変異体を分析した。さらに、his-INF- β 変異体とINFAR2との間の相互作用表面をマッピングするためのアッセイを開発した。これは、INFAR2/Ig融合タンパク質を利用し、ヒトIgG1のヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインに融合したINFレセプタータ

ンパク質 I FNAR2 細胞外ドメインからなった。

【0097】

(1. 変異誘発の鋳型としてのインターフェロンβ遺伝子の作製)

I FN-βのアラニン(またはセリン)置換変異体を生成するための本発明者の戦略は、最初に、改変 I FN-β 遺伝子を作製することであった。この遺伝子は、野生型タンパク質をコードするが、遺伝子を横切って散在する独特な制限酵素切断部位を有した。その独特な部位は、変異コドンでコードする合成オリゴヌクレオチド二重鎖についての野生型配列を交換するために使用された。変異遺伝子の作製のために適切なヒト I FN-β-1a 発現カセットを得るために、I FN-β cDNA (GenBank 登録番号 #E00029) を、PCR によって増幅した。I FN-β 遺伝子のプラスミド pJB107 (pACYC184 の誘導体、Rose 他、1988、Nucleic Acids Res. 16 (1) 355 を参照のこと) への最初のクローニングは、変異誘発を通して生成される特定の制限部位を欠くプラスミド中の遺伝子の部位特異的変異誘発を実行するために必要であった。

【0098】

ヒト I FN-β 遺伝子のコード配列をサブクローニングするために使用される PCR プライマーはまた、本発明者らに、その I FN-β 遺伝子の上流かつその遺伝子とインフレーションでエンテロキナーゼ切断部位を導入することを可能にした。5' PCR プライマー 5' TTCTCCGGAGACGATGATGACAAGATGAGCTACAATTTGCTTGGATTCTCTACAAAGAA GCTC-3' (配列番号 3: 「BET-021」) および 3' プライマー 5' -GCCGCTCGAGTTATCAGTTTTCGGAGGTAACCTGTAA GTC-3' (配列番号 4: 「BET-022」) ならびにプラスミド pMJB107 部位へのクローニングのために有用な隣接する制限酵素部位 (BspEI および XhoI)。得られる DNA は、PCR フラグメント A といわれる。

【0099】

ヒト血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) シグナル配列由来の効率的なシグナル配列および 6 ヒスチジンタグを、pDSW247 から生成された第 2 の DN

Aフラグメント（フラグメントB）からの最終構築物に導入した。プラスミド pDSW247は、pCEP4（Invitrogen, Carlsbad, CA）の誘導体であり、ここからEBNA-1遺伝子が欠失され、そしてこの誘導体は、6ヒスチジンタグの上流にかつこれとインフレームに融合されたVCAM-1シグナル配列（VCAMss）を有する。VCAMss-1/ヒスチジンタグカセット部分を生成するために使用されたPCRプライマーは、フラグメントB DNAの切除を可能にする、隣接する制限酵素切断部位（NotIおよびBspEI）を組み込んでいるKID369（5' PCRプライマー 5'-AGCTTCCGGGGGCCATCATCATCATCATCATAGCT-3'：配列番号5）およびKID-421（3' プライマー CCGGAGCTATGATGATGATGATGGCCCCCGGA-3'：配列番号6）であった。

【0100】

VCAM-1シグナル配列、hisタグおよびインターフェロン- β 遺伝子を有するプラスミドベクターを製作するために、本発明者らは、プラスミドベクターpMJB107（NotIおよびXhoI切断された）、PCRフラグメントA（BspEIおよびXhoI切断された）、およびフラグメントB（NotIおよびBspEI切断された）からゲル生成されたDNAフラグメントを使用して、3工程連結（three-way ligation）を行った。連結されたプラスミドを使用して、JA221またはXL1-BlueのE. coli細胞のいずれかを形質転換し、そしてアンピシリン耐性コロニーを拾い上げ、そして制限地図分析によってインサートについて試験した。ミニブレップDNAを複製し、そしてインサートの配列を、DNA配列決定によって確認した。得られた構築物を、pCMG260と名付けた。

【0101】

（2. pCMG260におけるヒトインターフェロン- β のアラニン置換変異体の作製）

プラスミドpCMG260を、多数回の変異誘発のための鋳型として使用した（U. S. E. 部位特異的変異誘発キット（Boehringer-Mannh

e i m))。これは、独特な制限切断部位を、I F N- β タンパク質コード配列に沿った位置に導入するが、タンパク質の得られる配列を変化させない。変異誘発されたプラスミドを使用して、E. coli の J A 2 2 1 または X L 1 - B l u e 株のいずれかを形質転換し、そして組換えコロニーをクロラムフェニコール耐性について選択した。クロラムフェニコール耐性コロニーを、さらに、DNA 制限マッピング分析によって、所望の独特な制限酵素部位の存在について試験した。得られる I F N- β プラスミドである、p C M G 2 7 5 . 8 は、独特な制限酵素切断部位の全セットを含み、そしてその遺伝子の DNA 配列を確認した。改変された、h i s タグ化インターフェロン- β 遺伝子の全 DNA 配列 (配列番号 1) は、タンパク質コード配列 (配列番号 2) とともに、図 1 0 に示される。

【0102】

アラニン置換変異のフルセットを、表 1 に示す (以下)。変異の名前は、変異が導入された構造的領域 (ヘリックスおよびループ) を特定する。アラニン (セリン) 置換の全体のパネルは、ヒト I F N- β の 1 6 5 アミノ酸のうちの 6 5 の変異を生じる。

【0103】

変異体のパネルを、p C M G 2 7 5 . 8 から、独特な制限部位間の DNA のセグメントを表 2 (以下を参照のこと) に示される遺伝子コード情報を有する合成オリゴヌクレオチド二重鎖と置換することによって作製した。種々のアラニン置換変異体プラスミドを作製するために、ゲル精製した p C M G 2 7 5 . 8 ベクター (各々の I F N- β 構造領域について以下のリストに示されるように、適切な制限酵素を用いて切断した) およびオリゴヌクレオチド二重鎖 (表 2 において示されるコード鎖配列) を一緒に連結した。連結混合物を使用して、E. coli の J A 2 2 1 株を形質転換し、そして組換えコロニーを、アンピシリン耐性について選択した。アンピシリン耐性コロニーを、適切な制限酵素部位についてスクリーニングすることによって変異の挿入の存在について試験した。2 つの変異体 (A 2 および C D 2) について、クローニングストラテジーは、合成ヌクレオチドの 2 つの二重鎖 (表 2 に示す) を使用することを伴った。この二重鎖は相補的な突出末端を有し、互いにおよびベクター I F N- β 骨格を 3 工程連結で連結す

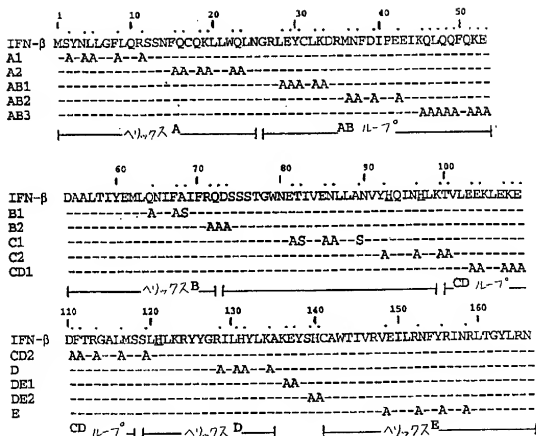
ることを可能にする。以下のリストは、表2からの変異したオリゴヌクレオチドをクローニングするために使用された部位を例証する。このクローニングスキーム(サブセクションB)は、インターフェロニンβ遺伝子上のこれらの独特な部位の位置を示す。

【0104】

(表1. ¹⁸¹IFN-βのアラニン置換変異の位置)

【0105】

【表1】



【0106】

IFN-βと示された線は、野生型ヒトIFN-β配列を示す。IFN-β残基のアラニン置換またはセリン置換を各々の変異体について示し、そして関連する領域の下にダッシュは、野生型配列を示す。ヘリックス構造およびループ構造と、変異体の下に実線として示す。DEループは、DヘリックスとEヘリックスとの間にわたる。2つのさらなるアラニン置換変異体(H93A、H97A、および

びH121A)を生成し、そして抗ウイルス活性において分析して、結晶構造二量体において亜鉛をキレートするこれらのヒスチジンを変異させる効果の評価した。これらの変異体の両方は、抗ウイルス活性において完全な野生型活性を保持しており、このことは、亜鉛媒介二量体形成が、IFN- β 活性に重要ではないことを示唆する。

【0107】

【表2】

| | | |
|-----|-----------------------------|---|
| A1 | SEQ ID NO: 7 BET-053 | CCGGAGACGATGATGACAAGATGGCTTACGCCGCTCTTGGAGCCCTACAAGC TTCTAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGCTCCTGTGGC |
| A2 | SEQ ID NO: 8 BET-039 | GATCTAGCAATGCTGCTCTGCTGCCCTCCTGGCTGCCTTGAATGGGAGGCTT GAATACT |
| | SEQ ID NO: 9 BET-041 | GCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA |
| AB1 | SEQ ID NO: 10 BET-080 | AATTGAATGGGAGGCTGCGAGCTTGGCTGCGAGCAGGATGAACTTTGACATCC CTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA |
| AB2 | SEQ ID NO: 11 BET-082 | AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGGCTGCATTTGCTATCCC TGCAGAGATTAAGCAGCTGCA |
| AB3 | SEQ ID NO: 12 BET-084 | AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACA |
| | SEQ ID NO: 13 BET-086 | TCCCTGAGGAGATTGCTGCGAGCTGCAGCTTTCGCTGCAGCTGA |
| B1 | SEQ ID NO: 14 BET-110 | CGCCGCGTTGACCATCTATGAGATGCTCGCTAACATCGCTAGCATTTTCAGACAA GATTCACTCTAGCACTGGCTGGAA |
| B2 | SEQ ID NO: 15 BET-112 | CGCCGCGATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACAATCTTGTATTTTCGCTGCAG CTTCATCTAGCACTGGCTGGAA |
| C1 | SEQ ID NO: 16 BET-114 | GGAA7GCTTCAATTGTTGCTGCACTCCTGAGCAATGTCTATCATCAGATAAACCATC TGAAGACAGTTCTAG |
| C2 | SEQ ID NO: 17 BET-092 | GGAA7GAGACCATTTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCGCTCATCAGATAGCACATC TGGCTGCAGTTCTAG |
| CD1 | SEQ ID NO: 18 BET-094 | CTAGCTGCAAAACTGGCTGCAGCTGATTTCAACCGGGGAAAAC |

[0 1 0 8]

(表2の続き)

| | | |
|-----|-----------------------------|---|
| CD2 | SEQ ID NO:19 BET-096 | CTAGAAAGAAAACTGGAGAAAGAAGCAGCTACCGCTGGAAAAGCAATGA GCGCGCTGCACCTGAAAAAGA |
| | SEQ ID NO:20 BET-106 | TATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACTCACACTGT |
| D1 | SEQ ID NO:21 BET-108 | CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGGCAATTGCTGCATACCTG GCAGCCAAGGAGTACTCACACTGT |
| DE1 | SEQ ID NO: 22 BET-116 | CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTG AAGGCCGCTGCATCTCACACTGTGCTGGACGAT |
| DE2 | SEQ ID NO: 23 BET-118 | CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGA AGGCAAGGAGTACGCTGCATGTGCTGGACGAT |
| E1 | SEQ ID NO:24 BET-104 | CGTCAGAGCTGAAATCCTAGCAAACTTTGCATTTCATTGCAAGACTTACAG |

【0109】

(B. EBN A293発現プラスミドの構築)

VCAM-1シグナル配列、hisタグ、ならびにエンテロキナーゼ切断部位に融合された野生型遺伝子および変異体IFN- β 遺伝子を、761塩基対Not IおよびBamHI制限フラグメントとしてゲル精製した。精製した遺伝子を、図式に示すように、Not IおよびBamHI切断したプラスミドベクターpDSW247にサブクローニングした。プラスミドpDSW247は、ヒトEBNA293腎臓細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)におけるタンパク質の一過性発現のための発現ベクターである。このベクターは、クローニングストラテジーについての図式(以下)に見られるように、サイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーターおよびこの系における高いレベルの遺伝子発現のために必要とされるEBV調節エレメント、ならびにE. coli (アンピシリン耐性)およびEBNA293細胞(ハイグロマイシン耐性)についての選択マーカーを含む。連結したプラスミドを使用して、JA221 E. coli細胞またはXL1-Blue E. coli細胞のいずれかを使用して形質転換し

、そしてアンピシリン耐性コロニーを拾い上げて、制限地図分析によってインサートについて試験した。マルチプレックスDNAを作製し、そしてインサートの配列をDNA配列決定によって確認した。所望の変異した配列を示すポジティブクローンを使用して、以下に記載するように、ヒトEBNA293腎臓細胞をトランスフェクトするために使用した。

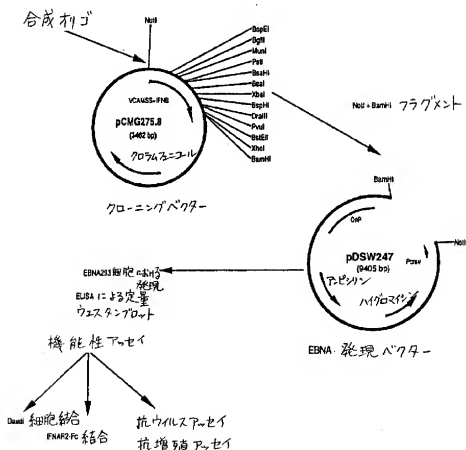
【0110】

全体のクローニングストラテジーを以下に示す：

(クローニングストラテジーおよびIFN- β 発現プラスミドの図的表現)

【0111】

【化1】



【0112】

(C. IFN- β -1aアラニン置換変異体の発現および定量)

ヒトEBNA293細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA,

Chittenden, T. (1989) J. Virol. 63:3016-3025) を、10%胎仔ウシ血清、2mM グルタミン、および250 μ g/ml Geneticin (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を補充したダルベッコ改変イーグル培地中のサブコンフルエント培養物として維持した。pDSW247発現プラスミドを、リポフェクタミンプロトコル (Gibco/BRL, Life Technologies) を使用してEBNA 293細胞中に一過性にトランスフェクトした。馴化培地を、トランスフェクションの3~4日後に収集し、細胞細片を遠心分離によって取り除き、そしてhis-IFN- β 濃度をELISAによって定量した。

【0113】

ELISAアッセイを、ポリクローナルウサギ抗体 (プロテインA精製したIgG、抗体は精製したヒトIFN- β -1aに対して惹起された) を用いて96ウェルELISAプレートにコートして行い、そして同じポリクローナルウサギIgGのビオチン化型を、ストレプトアビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP: Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA) を用いるインターフェロン検出を可能にする二次試薬として使用した。インターフェロン- β -1aの一連の希釈を使用して、標準濃度曲線を生成した。EBNAトランスフェクト体からのhis-IFN- β 含有馴化培地を、希釈して、ELISAアッセイにおける10ng/mlと0.3ng/mlとの間の範囲の濃度を有するサンプルを得た。ELISAによって決定された培地中のIFN- β の濃度を確認するために、ウェスタンブロット分析を実行した。還元した培養上清およびIFN- β -1a標準を、10~20%勾配ゲル (Novex, San Diego, CA) 上のSDS-PAGEに供し、そしてPDVF膜上にブロットした。免疫反応性バンドを、ウサギポリクローナル抗IFN- β -1a抗血清 (#447, Biogen, Inc.、二次抗血清はIFN- β -1aに対して惹起された)、続いてHRR結合ロバ抗ウサギIgG (Jackson ImmunoResearch) を用いる処理を用いて検出した。

【0114】

(D. レセプター結合についてのインターフェロン- β 変異体の評価)

Cにおいて記載されたインターフェロン- β 変異体のレセプター結合特性を、2つの異なる結合アッセイを使用して評価した。1つのアッセイは、融合タンパク質IFNAR2/Igに対するインターフェロン- β 変異体の結合を測定した。この融合タンパク質は、ヒトIgGの定常領域の部分に融合したヒトIFNAR2レセプター鎖の細胞外ドメインを含む。IFNAR2-Fcを、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)細胞中で発現し、そして製造業者の指示書(Pierce Chem. Co., Rockford, IL, カタログ番号#20334)に従ってプロテインAセファロースアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。インターフェロン- β 変異体のIFNAR2-Fcへの結合を、ELISA形式アッセイにおいて測定した。ELISAプレートに、コーティング緩液(50mM NaHCO₃, 0.2mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, pH 9.6)中10 μ g/mlのマウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体(CDG5-AA9, Biogen, Inc.)を50 μ l/ウェルで、4℃で一晩、平底96ウェルプレートをコートすることによって調製した。プレートを、0.05% Tween-20を含むPBSで2回洗浄し、そしてPBS中0.5%脱脂粉乳で、室温で1時間ブロックした。2回以上の洗浄後、0.05% Tween-20を含むPBS中の0.5%ミルク中の1 μ g/ml IFNAR2-Fcの50 μ lを各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートし、次いでプレートを2回以上洗浄した。インターフェロン- β 変異体のIFNAR2-Fcへの結合を、50 μ l/ウェルの変異体インターフェロン- β 馴化培地(10%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で連続的に希釈した)中に添加すること、および4℃で2時間インキュベートすることによって測定した。インターフェロン- β 変異体の希釈は、代表的には、およそ1 μ Mから下方に10pMまでの範囲であった。洗浄後、プレートに結合したインターフェロン- β を、ウサギポリクローナル抗インターフェロン抗体(#447)および西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識化ロバ抗ウサギIgG(Jackson ImmunoResearch)の1:100希釈からなるカクテルの50 μ l/ウェルを添加すること、および4℃で15分間インキュベートすることによって検出した。2回の洗浄の後、HRP基質

を添加し、そしてプレートに4℃でインキュベートし、その後ELISAプレートリーダー上で450nmの吸光度を読みとった。データを、吸光度対変異体インターフェロン-βの濃度をプロットし、そして変異体インターフェロン-βのIFNAR2-Fcへの結合についての親和性を単純な双曲線式に一致させることによって決定した。これらの分析からの結果を図1に示し、ここでは、少なくとも3つの独立した実験から決定された各変異体についての結合親和性が、His6-野生型インターフェロン-β-1aについて測定された親和性の割合として表現される。

【0115】

第2のレセプター結合アッセイを使用して、インターフェロン-β変異体が両方のレセプター鎖(IFNAR1およびIFNAR2、これらは、ともにインターフェロン-βについてのレセプターを含む)を発現するDaudi細胞に結合する親和性を測定する。このFACSに基づくアッセイは、インターフェロン-βが結合したレセプターから、占有されていない(遊離の)レセプターを区別するために、IFNAR1、EA12(Biogen, Inc.)の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体をブロックすることに使用した。Dauri細胞(2.5×10^7 細胞/mlで20μl)を、96ウェルV底ELISAプレートに配置し、そして種々の濃度のインターフェロン-β変異体(20μlのFACS緩衝液中; 5% FBS、PBS中の0.1% NaN₃)とともに4℃で1時間インキュベートした。インターフェロン-β変異体の所望の連続希釈は、0.5μMから下方に0.5pMまでの範囲であった。各ウェルに100ngのビオチン化マウス抗IFNAR1モノクローナル抗体EA12(10μl)を添加し、そしてプレートを室温で2分間インキュベートし、その後FACS緩衝液で2回洗浄した(4℃)。次いで、細胞を、R-フィコエリトリン結合体化ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch)の1:20希釈の50μl/ウェルとともに4℃で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で2回洗浄し、0.5%パラホルムアルデヒドを含む300μlのFACS緩衝液に再懸濁し、そして12×75mmポリスチレンチューブ(Falcon 2052)に移した。次いで、サンプルをFACSscan(Becton

Dickinson) 上のフローサイトメトリーによって分析した。データを、平均チャネル蛍光強度 (MFC I) 対インターフェロン- β 変異体の濃度としてプロットし; 結合親和性を、抗体染色の 50% 阻害を与えるインターフェロン- β の濃度として規定した。各変異体を、複数回試験した。図 2 は、本発明の方法によって決定され、各実験において His 6-野生型インターフェロン- β -1 a について測定された親和性の割合として表現された、各インターフェロン- β についてのレセプター結合親和性を示す。

[0116]

(E. 機能についてのインターフェロン- β 変異体の評価)

インターフェロン- β 変異体をまた、抗ウイルス活性に関するインビトロアッセイを用いて機能的な活性について、そして細胞増殖を阻害するインターフェロン- β の能力について試験した。各々三つ組のデータ点を伴った、最低三回の抗ウイルスアッセイを、各々の変異体において実施した。His 6-野生型インターフェロン- β -1 a を、すべての実験において基準として含めた。この抗ウイルスアッセイは、変異インターフェロン- β の 2 倍階段希釈を用いて、ウイルスによる細胞死滅からの完全な抗ウイルス防御と無防御との間の範囲にわたる濃度で、A549 ヒト肺癌細胞 (ATCC CCL 185) を一晚処理することによって実施した。次の日、この細胞を、脳心筋炎ウイルス (ECMV) を用いて、インターフェロンの存在なしに完全な細胞の死滅を生じる希釈度で、2 日間チャレンジした。次いで、プレートに、代謝性色素である MTT (2, 3-ビス [2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル] -2H-テトラゾリウム-5-カルボキシアニリド) (M-5655, Sigma, St. Louis, MO) を用いて発色させた。MTT のストック溶液を、PBS 中に 5 mg/ml で調製し凍結滅菌し、そしてこの溶液 50 μ l を、細胞培養液中に希釈した (100 μ l/ウェル)。室温で 30~60 分間のインキュベーションに続いて、MTT/培地溶液を捨て、細胞を、100 μ l の PBS を用いて洗浄し、そして最後に代謝された色素を、90% イソプロパノール中の 1, 2N の塩酸 100 μ l 中に可溶化した。生存細胞 (色素の存在によって証明されるように) を、450 nm の吸光度によって定量した。データを、インターフェロン- β 変異体の濃度と

対する吸光度をプロットすることによって解析し、各々の変異体の活性を、50%の細胞が死滅する濃度として規定した。図3は、各々の実験におけるヒスタグ化野生型インターフェロン β -1aについて、測定された活性の百分率として表された各々の変異体の活性を示す。

【0117】

インターフェロン β 変異体をまた、抗増殖アッセイにおいて機能に関して評価した。ヒトDauid Burkitt'sリンパ腫細胞(ATCC#CCL213)を、10%の限定された胎仔ウシ血清(Hyclone, Logan Utah)および2mMのL-グルタミンを添加したRPMI1620中に、 2×10^5 細胞/mlで播種した。各々のウェルはまた、100 μ l/ウェルの最終総容量の培地中に、インターフェロン β 変異体の所定の濃度を含む；用いられたインターフェロン β 濃度を、Dauid細胞の増殖の最大阻害から無阻害(すなわち、完全な増殖)までの間の範囲にわたって選んだ。二つ組の実験点を、試験されたインターフェロン β 変異体の各々の濃度について用い、そして二つ組のセットの未処理細胞を、すべての実験に含めた。細胞を、37℃で2日間、5%のCO₂インキュベーター内でインキュベートし、50 μ l培地中に1 μ Ci/ウェルのトリチウム化チミジン(メチル-³H)チミジン、Amersham TRK758)を、各々のウェルに添加した後、さらに4時間インキュベートした。細胞を、LKBプレートハーベスターを用いて回収した。そして、トリチウム化チミジンの取りこみをLKB β プレートリーダーを用いて測定した。二つ組の実験の値を平均化し、そして標準偏差を決定した。データを、平均数/分 対 インターフェロン β 変異体の濃度としてプロットし、各々の変異体の活性を、観察される増殖阻害の最大値の50%を示すのに必要な濃度として定義した。各々の変異体についての複数のアッセイを、実施した。図4は、各々の実験におけるヒスタグ化野生型インターフェロン β -1aについて見出された活性の百分率として表された結果を示す。

【0118】

(F. インターフェロン β 変異体の特性)

ヒスチジンタグ化野生型インターフェロン β -1aは、抗ウイルスアッセイ

および抗増殖アッセイにおいて、タグのない野生型インターフェロン β -1 a について見出される対応する活性の各々約1/3の活性を有することが見出された。インターフェロン β 変異体A1-Eのすべてが同一のヒスタグ配列をそのN末端に含むので、この分子の特性における変異体の効果は、抗ウイルスアッセイ、抗増殖アッセイおよび結合アッセイに対するこれらの変異体の活性を、ヒスタグ化野生型インターフェロン β -1 a について観察される活性と比較することによって決定した。そうすることにおいて、本発明者らは、ヒスタグ化野生型インターフェロン β -1 a と比較した変異体A1-Eの活性における変動が、これら同一の変異体がN末端のヒスタグの非存在下で有する効果と、定性的および定量的にほぼ同一であることを仮定する。他の可溶性サイトカインのタグ化または融合構築物についての等価な仮定は、特に、タグ化または融合構築物のインビトロでの機能的な活性が、本明細書中の場合のように野生型サイトカインの活性と近接する場合、アラニンスキャンニング変異誘発の技術の熟練者は一般に正しいと考える。例えば、Pearce K. H. Jrら、J. Biol. Chem. 272:20595-20602 (1997) および Jones J. T. ら、J. Biol. Chem. 273:11667-11674 (1998) を参照のこと。

[0119]

図1~4に示したデータは、標的化された変異誘発によって生じた効果の3つの型を示す。これらの効果は、特定の環境下でのインターフェロン薬物の開発について有利であり得る。この効果の3つの型は、以下である：(a) 野生型インターフェロン β -1 a の活性よりも高い抗ウイルス活性を伴う変異体（例えば、C1変異体）；(b) 抗ウイルスアッセイおよび抗増殖アッセイの両方において活性を示すが、野生型インターフェロン β -1 a と比較して、抗ウイルス活性の割には抗増殖活性が不釣り合いに低い変異体（例えば、C1、DおよびDE1変異体）；および(c) 野生型インターフェロン β -1 a と比較して、レセプター結合に対して不釣り合いに低い抗ウイルス活性および抗増殖活性を示す、機能的なアンタゴニスト（例えば、A1、B2、CD2およびDE1）。いくつかの変異体が、一つを超えるクラスに分類されることが理解され得る。これらのクラ

スを、以下に総説する。リストされたこれらの例に関して、これらのクラスの変異体の特徴付けの一方、これらの領域の他の変異体が活性に対して類似の、またはさらに増強された効果を生じ得ることが評価されるべきである：

a) 変異体C 1は、野生型ヒスタグ化インターフェロノン β -1 aの有する活性に比べて約6倍を超える抗ウイルス活性を有する。この変異体およびこの型の他の変異体は、抗ウイルス効果の所定のレベルを達成するために投与されなければならないインターフェロノン β の量を減少するのに有用であることが予想される。投与されたタンパク質の量の低下は、このタンパク質の免疫原性を減少することを予想させ、そして機序に基づかない毒性からの副作用をまた減少し得る。このクラスの変異は、インターフェロノン β 投与の治療的利点とその抗ウイルス効果から生じ、そして抗増殖効果が毒性または所望されない副作用に寄与するといった状況において有利であると予想される。

[0 1 2 0]

(b) 抗ウイルスアッセイおよび抗増殖アッセイにおけるアラニン置換変異体の相対的な活性(%野生型)を、図5において比較する。座標的に変化した活性(すなわち、野生型ヒスタグ化インターフェロノン β -1 aの活性とは、同一因子によって異なる抗ウイルス活性および抗増殖活性)は、ほとんどの変異体において見られる(対角線にある)。しかし、いくつかの変異体は、対角線からのずれによって証明されるように、野生型ヒスタグ化インターフェロノン β -1 aに比較して、その他と相対的な一つのアッセイにおける活性により大きな変更を示す。3つのこのような変異体を、以下の表3に示す。変異体C 1は、野生型ヒスタグ化インターフェロノン β -1 aの活性よりも約6倍高い抗ウイルス活性を示すが、抗増殖アッセイにおける活性は、野生型のそれと類似する。従って、変異体C 1は、野生型ヒスタグ化インターフェロノン β -1 aに対して、その抗増殖活性を5. 2倍だけ増強された抗ウイルス活性を有する。同様に、変異体Dは、抗ウイルスアッセイにおいて野生型の活性の65%を示すが、抗増殖アッセイにおいては野生型の活性のたった20%を示し、従って、野生型に比べてその抗増殖活性の3. 4倍増強された抗ウイルス活性を有する。変異体DE 1は、抗ウイルスアッセイにおいて野生型の活性の26%を示すが、抗増殖アッセイにおいて

はたった 8.5%を示し、従って、野生型ヒスタグ化インターフェロン- β -1 a に比べてその抗増殖活性の 3.0 倍増強された抗ウイルス活性を有する。所望の抗ウイルス活性のレベルに達するのに十分な濃度において投与される場合、これらの変異体タンパク質は、野生型タンパク質より実質的に低いレベルの抗増殖活性を示す。クラス (a) 中のもののようなこのクラスの変異体は、インターフェロン- β 投与の治療的利点とその抗ウイルス効果から生じ、そして抗増殖効果が毒性または所望されない副作用に寄与するといった状況において有利であると予想される。

【0121】

【表 3】

| 変異体 | 抗ウイルス活性 (AV) (%野生型) | 抗増殖活性 (AP) (%野生型) | AV/AP |
|-----|------------------------|----------------------|-------|
| C1 | 571 | 109 | 5.2 |
| D | 65 | 19 | 3.4 |
| DE1 | 26 | 8.5 | 3.0 |

【0122】

(c) 野生型ヒスタグ化インターフェロン- β -1 a に比べてレセプター結合が低い抗ウイルス活性および抗増殖活性を伴う変異体 (下の表 4 を参照のこと)。変異体 A1 は、野生型ヒスタグ化インターフェロン- β -1 a に関して観察される活性より 2.0 倍および 1.8 倍高い抗ウイルス活性および抗増殖活性を示すが、Dauidi 細胞上の同族のレセプターに野生型より 2.9 倍高い親和性を伴って結合する。従って、この変異体の IFN- β レセプターへの結合は、このタンパク質の抗ウイルス活性および抗増殖活性に比べて約 1.5 倍増強される。同様に、変異体 B2、CD2 および DE1 は、それぞれ、4.6 倍、4.6 倍および 1.8 倍の抗ウイルス活性を越える、そして 3.5 倍、1.5 倍および 5.4 倍の抗増殖活性を越える結合の増強性を示す。これらのタンパク質は、内在性 IFN- β 、およびおそらく他の内在性タイプ I インターフェロンの活性の機能的なアンタ

ゴニストとして有用であることが予想される。なぜなら、これらが、レセプターに結合する能力およびレセプターを占有する能力を有し、そしてなお野生型 IFN- β と共にみられる標的細胞における機能的な応答のごく小さな割合を生じるからである。

【0123】

【表4】

| 変異体 | 抗ウイルス活性 (AV) (%wt) | 抗増殖活性 (AP) (%wt) | 細胞結活性 (%wt) | 結合/AV | 結合/AP |
|-----|-----------------------|---------------------|----------------|-------|-------|
| A1 | 200 | 180 | 2900 | 15 | 16 |
| B2 | 7.1 | 9.2 | 33 | 4.6 | 3.5 |
| CD2 | 150 | 46 | 690 | 4.6 | 15 |
| DE1 | 26 | 8.5 | 460 | 18 | 54 |

【0124】

(G、インターフェロンの3次元構造に対するムテイン関連性)

マウスインターフェロン- β の非グリコシル化型 (T. Senda, S. Saitoh および Y. Mitsui, Refined Crystal Structure of Recombinant Murine Interferon- β at 2.15 Å Resolution, J. Mol. Biol. 253:187~207 (1995)) およびヒトインターフェロン- α 2b (R. Radhakrishnan, L. J. Walter, A. Hruza, P. Reichert, P. P. Trotta, T. L. Nagabhushan および M. R. Walter, Zinc Mediated Dimer of Human Interferon- α 2b Revealed by X-ray Crystallography, Structure, 4:1453~1463 (1996)) に関する発表された結晶構造が、ヒトインターフェロン- β のペプチド骨格のモデルを提供した一方、本発明者らは、インターフェロン- β のグリコシル化状態に関する構造を最近解析した (M. Karpus

s, M. Nolte, C. B. Benton, W. Meier, W. N. Lipscomb, および S. E. Goelz. The Crystal Structure of Human Interferon- β at 2.2 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 11813~11818 (1997))。

【0125】

本発明者らの変異の解析の結果は、インターフェロン- β -1a の3D構造に関して要約され得る(本明細書中には示さず)。特定の変異体は、活性において(2~5倍以上に減少した)減少を生じた。この変異された領域は、表1および2に与えられた置換に一致した。抗ウイルス活性および抗増殖活性に重要な残基は、インターフェロン- β -1a 分子の下半分に位置する(パネルaおよびb)。アミノ末端およびカルボキシ末端が位置されるこの分子の上半分における変異は、生物学的な活性およびレセプター結合に対する効果を有さない。

【0126】

A2ヘリックス、AB、AB2ループおよびEヘリックスの変異は、機能上のこれらの効果において最も重要であり、両活性および細胞表面レセプター結合の劇的な減少を生じる。本発明者らのアッセイにおいてこれらの変異体のいずれもIFNAR/Fcに結合しなかったため、この領域(A2ヘリックス、ABおよびAB2ループならびにEヘリックス)は、IFNAR2結合部位に一致する。

【0127】

IFNAR2結合に重要なこれらの変異もまた細胞の結合に影響を及ぼす一方、細胞表面結合特性もまた、この分子の他の領域(B1ヘリックス、C2ヘリックス)の残基によって影響される。これは、インターフェロン- β -1a 分子のN末端、C末端およびグリコシル化Cヘリックス領域がレセプター結合部位の中に見られ得る。これらの領域における変異は、生物学的活性を減少せず、細胞表面レセプター結合も減少しない。

【0128】

(実施例2: 結合体化インターフェロン- β -1a の調製および特徴付け)

(A. PEG化 (PEGylated) インターフェロンの調製)

250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の非処方インターフェロン- β -1a (AVONEX (登録商標) として販売) バルク中間体 (100mM のリン酸ナトリウム pH 7.2、200mM のNaCl中) を、等量の100mM MES pH5.0 に希釈し、pHを、HClを用いて5.0に調整した。このサンプルを、6mg インターフェロン- β -1a/ml 樹脂でSP-Sepharose (登録商標) FF column (Pharmacia, Piscataway, NJ) 上にロードした。このカラムを、5mM のリン酸ナトリウム pH5.5、75mM のNaClを用いて洗浄し、産物を、30mM のリン酸ナトリウム pH6.0、600mM のNaClを用いて溶出した。溶出画分を、280nmでその吸光度を分析し、そしてサンプル中のインターフェロンの濃度を、1mg/ml 溶液に関して1.51の吸光係数を用いて吸光度より推定した。

【0129】

SP溶出液からのインターフェロン- β -1aの1mg/ml溶液に、0.5Mリン酸ナトリウム pH6.0を、50mMになるように加え、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (Aldrich, Milwaukee, WI) を、5mMになるように加え、そして20K PEGアルデヒド (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) を、5mg/mlになるように加えた。このサンプルを、室温で20時間インキュベートした。PEG化インターフェロンを、移動相として5mMのリン酸ナトリウム pH5.5、150mMのNaClを用いてSuperose (登録商標) 6 FPLCサイズ分離カラム (sizing column) (Pharmacia) およびSP-Sepharose (登録商標) FFに始まる一連のクロマトグラフィー工程により反応産物より精製した。サイズ分離カラムの結果、改変型および非改変型のインターフェロン- β のベースライン分離を生じた (本明細書中にはクロマトグラフは示さず)。ゲル通過からのPEG-インターフェロン- β 含有溶出プールを、水を用いて1:1に希釈し、そして、SP-Sepharose (登録商標) カラム上に2mgインターフェロン- β /ml 樹脂でロードした。このカラムを、5mMのリン酸ナトリウム pH5.5、75mMのNaClを用いて洗浄し、

次いでPEG化インターフェロニン β を、5 mMのリン酸ナトリウム pH 5.5、800 mMのNaClを用いてカラムから溶出した。溶出画分を、280 nmでの吸光度によってタンパク質含量を分析した。PEG部分が280 nmでの吸光度に寄与しない場合、このPEG化インターフェロニン β 濃度を、インターフェロニン当量において報告する。

(B. PEG化インターフェロニンの生化学的な特徴付け)

サンプルを、SDS-PAGEによって改変の程度を分析した(本明細書中にはゲルは示さず)。1つのPEGの付加によって、分析において容易に明らかな20 kDaから55 kDaへインターフェロニンの見かけの分子量におけるずれが生じた。PEG化サンプルにおいて、非改変型インターフェロニン β の証拠もさるなるPEG基の存在により生じる高分子量型の証拠も、いずれも存在しない。1つのPEGの存在を、MALDI質量分析法によって確認した。PEG化反応の特異性を、ペプチドマッピングによって評価した。240 μ lの200 mM Tris HCl pH 9.0、1 mM EDTA中のPEG化インターフェロニン β -1aの20 μ gアリコート、およびコントロールとしての非改変型インターフェロニン β -1aを、*Achromobacter*由来のリシルエンドプロテアーゼ(Wako Bioproducts, Richmond, VA) 1.5 μ gを用いて27℃で3~4時間消化した。200 mgのグアニジンHClを、各々のサンプルに加え、そして切断産物を、Vydac C₄カラム(0.46 \times 25 cm)上で0.1% TFA中に0~70%のアセトリルの30分間の勾配を用いて、1.4 ml/分の流速で分画した。このカラム溶出物を、214 nmの吸光度についてモニターした。

【0130】

この解析の結果を、図6に示す。インターフェロニン β -1aのエンドプロテアーゼLys-C切断からの予想されたペプチド全てを、N末端配列決定法および質量分析法によって同定し、これらのペプチドのうちインターフェロニンのN末端(AP8)を含むペプチドのみが、マップからのその消滅によって明らかなように、改変によって変化した。従って、このマッピングデータは、PEG部分がこのペプチドに特異的に付着することを示す。このデータは、N末端改変のみが

このペプチドの特異的な消失を生じたので、PEG改変がタンパク質のN末端に標的化されるということを示す。

【0131】

この結論についての更なる証拠は、エンドプロテアーゼLys-C切断からPEG化N末端ペプチドを単離し、切断されたペプチドをさらに、臭化シアン(CNBr)を用いて切断し、そしてこのサンプルを、ソース崩壊後マトリックス補助レーザー脱離イオン化(matrix assisted laser desorption ionization post source decay)(MALDI-PSD)配列決定解析に供することによって得た。N末端ペプチドのCNBr切断はさらに、このペプチドをPEG部分を含む末端メチオニン(M1)およびSYNLLGFLQR(この成熟インターフェロンβ配列の残基2~11)の二つのペプチドに切断し得る。配列決定分析は、この処理の予想された結果である非改変型ペプチドSYNLLGFLQRを同定した。

【0132】

インターフェロンβ-1aサンプルの抗ウイルス活性を、上で既述したMTT染色を含む手順を用いて脳筋筋炎(EMC)ウイルスに曝露されたヒト肺癌細胞(A549細胞)に対して試験した。簡単には、A549細胞を、ウイルスのチャレンジ前に、インターフェロンβ-1aまたはPEG改変インターフェロンβ-1a(4000、2000、1000、500、250、125、75、62.5、31.25、50、33.3、22.2、14.8、9.9、6.6、4.39pg/ml)を用いて24時間前処理した。このアッセイを、各々のインターフェロンβ-1a濃度に対する二つ組のデータ点を用いて実施した。標準偏差を、図7中にエラーバーとして示す。50%ウイルス死滅度(「50%の細胞変性効果」)(50%の最大値OD₄₅₀)を提供するインターフェロンβ-1a(処方されたか、またはバルク)の濃度は、約11pg/mlであり、そしてPEG改変インターフェロンβ-1aに関する50%細胞変性効果は、約11pg/mlである。従って、PEG結合は、インターフェロンβ-1aの抗ウイルス活性を変化させない。このアッセイにおいて、本発明者らは、インターフェロンβ-1aの比活性が、インターフェロンβ-1bの比活性より

約10倍大きいことを日常的に見出し、従って、PEG化インターフェロノーβ-1aは、任意のインターフェロノーβ-b産物よりも有意により活性である。

【0133】

インターフェロノーβ-1aをまた、Fluka、Inc (Cat. No. 75936、Ronkonkoma、NY)から購入した5K PEGアルデヒド部分を用いて、2mg/mlの5K PEGを含む反応を除いて20K PEGアルデヒドを用いた改変のために記載された同一の手順に従って、PEG化した。5K PEGを用いた改変もまた、N末端に対して非常に特異的であり、インターフェロノーβ-1aの抗ウイルス活性を変化させない。20K添加物に類似して、5K PEG インターフェロノーβ-1aは、抗ウイルスアッセイにおいて非改変インターフェロノーβ-1aと区別できなかった。

【0134】

(実施例3. PEG化は、インターフェロノーβ-1aをストレス誘導型凝集から保護する)

インターフェロノーβの凝集は、活性に有害な効果を有する。以前に、本発明者らは、インターフェロノーβの非グリコシル化型と対比して、グリコシル化がインターフェロノーβ-1aの安定性に劇的な効果を有することを示し、グリコシル化がインターフェロノーβ-1aのより高い比活性に寄与することを推測した(Runkel L. ら、Pharm. Res. 15:641~649)。ポリリアルキレングリコールポリマーとの結合体化がさらにインターフェロノーβを安定化し得るか否かを研究するために、本発明者らは、PEG化インターフェロノーβ-1aを以下の手順を用いた熱ストレスに供した：

熱変性を、コンピューター制御の電熱性(thermoelectrically heated)キュベットホルダーを取り付けたCARY 3 UV可視化分光光度計を用いて実施した。20mM HEPES pH7.5、20mM NaCl中のインターフェロノーβ-1aの溶液を、1mlキュベットの中で25℃で平衡にした。次いでキュベットホルダーの温度は、2℃/分の割合で25℃~80℃へ勾配をなし、そしてタンパク質の変性を280nmでの吸光度の連続的なモニタリングにより追跡した。この協同的な進展の事象の中間点であるT

mは、計測された吸光度が、協同的な進展の遷移のいずれかの側の直線的な領域から外挿された直線によって規定された値の間の中途である温度の決定による融解曲線から得られた。

【0135】

この分析からの結果を、図8に示す。非PEG化インターフェロン-β-1aが60℃での50%の遷移点を伴って変性されかつ凝集されたのに対して、80℃でさえPEG化インターフェロン-βの凝集の証拠は存在しなかった。独立した解析において、本発明者らは、熱ストレスの処理を95℃に拡大し、そしてこのより高い温度でさえ、本発明者らは、凝集の証拠を見ていない。従って、このポリアルキレングリコールポリマーとの結合体は、このタンパク質の安定性に対して顕著かつ有益な効果を有する。類似の安定性は、20K PEGおよび5K PEGを含む改変インターフェロン-β-1aを用いて見られる。

【0136】

(実施例4. インターフェロン-β-1aおよびPEG化インターフェロン-β-1aを処置をしたマウス血漿中のインターフェロン-β-1a抗ウイルス活性の測定)

マウス(C57B1/6)に、50,000単位のインターフェロン-β-1aまたは20K PEGを含む50,000単位のPEG化インターフェロン-β-1aまたはコントロールとして与える等量のリン酸緩衝液のいずれかを、尾静脈を通じて静脈注入した。これらのマウスからの血液は、注入後異なる時間点において眼窩採血を介して得られた(直後、0、25、1、4、24および48時間)。各々の時間点において少なくとも3匹のマウスを採血する。全血を抗凝血漿を含むチューブに回収する一方、細胞を、除去し、そして生じる血清を、アッセイの時まで凍結した。次いでこれらの血漿サンプルを、抗ウイルスアッセイにおいて試験した。

【0137】

この血漿サンプルを、無血清培地中に1:10に希釈し、0.2μmのシンジフィルターに通した。希釈したサンプルを、抗ウイルスアッセイに試験する。サンプルを、A549細胞を含む96ウェル組織培養プレートの指定されたウェ

ル中に滴定する。標準インターフェロン- β -1 a の希釈 (10、6、7、4、4、2、9、1、3、0、9 および 0.6 U/m l) および 4 つの血漿サンプルの希釈を、全てのプレートでアッセイした。A549 細胞を、EMC ウイルスのチャレンジの前に、希釈された血漿サンプルを用いて 24 時間前処理した。ウィルスを用いた 2 日間のインキュベーションに続いて、生存細胞を、MTT (リン酸緩衝液中に 5 mg/m l) の溶液で 1 時間染色し、リン酸緩衝液で洗浄し、そしてイソプロパノール中の 1.2 N の HCl で可溶化する。ウェルを、450 nm で読み取った。標準曲線を、各々のプレートに生成し、そして各々の試験サンプル中のインターフェロン- β -1 a の量を決定するのに用いた。異なるマウスからのサンプル中の活性を、図 9 において時間点に対してグラフ化した。

【0138】

時間の関数として、PEG 化インターフェロン- β -1 a の循環からのより緩やかな消失は、PEG 化サンプルの半減期が未処理インターフェロン- β -1 a コントロールの半減期よりも長いことを示す。コントロールが 4 時間後にほとんど消失したのに対して、PEG 化産物の有意な割合は、48 時間後に検出された。血清中の最初の活性のレベルおよび 48 時間後に残るレベルに基づいて、本発明者らは、PEG 化インターフェロンの半減期が、非改変インターフェロン- β -1 a の半減期に比べて延長したことを推測する。本研究からの第二の非常に重要な発見は、0 時および 60 分後の類似する高いレベルの活性によって証明されるように、PEG 化形態が分布相の間にほとんど失われないことである。このデータは、PEG 化産物の分布がコントロールインターフェロン- β -1 a とは異なり、血管系に非常に限定されることを示す。

【0139】

(実施例 5 : 霊長類における比較の薬物動態および薬力学)

(一般的プロトコール)

比較研究をポリマーインターフェロン- β -1 a 結合体およびネイティブなインターフェロン- β -1 a (非処方化バルク中間体インターフェロン- β -1 a (リン酸ナトリウムおよび NaCl、pH 7.2 中) の場合) で実行し、霊長類におけるそれらの相対的安定性および活性を決定する。これらの研究において、

霊長類におけるポリマー-インターフェロン- β 1 a 結合体の薬物動態および薬力学は、ネイティブなインターフェロン- β 1 a の薬物動態および薬力学を比較し、そして合理的な推論をヒトにおいて予期し得る。

【0140】

(動物および方法)

(研究デザイン)

これは、結合体化されたインターフェロン- β 1 a および結合体化されていないインターフェロン- β 1 a の比較の薬物動態および薬力学を評価するための、並行する群の反復用量研究である。

【0141】

健康な霊長類（好ましくはアカゲザル）を、本研究のために用いる。投与の前に、全ての動物を、試験物投与前の14日以内に、2回の機会で、Lab Animal Veterinaryにより疾病、健康の徴候について評価する：1回の評価は最初の試験物投与前の24時間内で行われなければならない。健康動物のみに試験物を投与する。評価には、一般的な身体的検査、およびベースラインの臨床病理のための投与前の血液採取、およびインターフェロン- β 1 a に対するベースラインの抗体レベルを含む。全ての動物を秤量し、そして体温を試験物投与前の24時間内に記録した。

【0142】

12例の被験体を登録し、PEG-インターフェロン- β 1 a 結合体または非結合体のいずれか（さもなければインターフェロン- β 1 a そのもの）として、インターフェロン- β 1 a の1 MU/kg を投与するグループに割当てる。投与は、皮下（SC）経路または静脈内（IV）経路のいずれかである。全ての動物は、インターフェロン- β 処置に未経験でなければならない。それぞれの動物は、2回の機会に投与される；用量は、4週間まで間隔をあけられる。この用量の容積は1.0 mL/kg である。

【0143】

各注射後、種々の時間間隔で、薬物動態学的試験のために血液を採取する。インターフェロンが誘導した、生物学的応答マーカーである血清ネオプロテリンの測

定のための血液サンプルをまた、研究薬物の投与後、採取する。

【0144】

研究期間の評価としては、毒性の兆候について、投与後30分および1時間で行った臨床観察を含む。毎日、ケージのそばで観察を行い、そして全身の外観、毒性の徴候、不快感および挙動における変化を記録する。体重および体温を、投与後21日間を通じて一定間隔で記録する。

【0145】

(アッセイ方法)

血清中のインターフェロン β のレベルを、細胞変性効果 (CPE) バイオアッセイを用いて定量する。CPEアッセイは、インターフェロン媒介性抗ウイルス活性のレベルを測定する。サンプル中の抗ウイルス活性のレベルは、血液が吸引された時点でそのサンプル中に含まれている活性なインターフェロンの分子数を反映する。このアプローチは、インターフェロン β の薬物動態を評価する標準的な方法であった。この研究で用いられるCPEアッセイは、インターフェロン β が、ヒト肺癌腫細胞 (A549、#CCL-185、ATCC、Rockville, MD) を、脳心筋炎 (EMC) ウイルスに起因する細胞傷害性から防御する能力を検出する。この細胞を、インターフェロン誘導性タンパク質 (これは次いで、抗ウイルス反応を上昇する) の誘導および合成を可能にするため血清サンプルとともに15~20時間ブレインキュベートする。後に、EMCウイルスを添加し、そしてさらに30時間インキュベートし、その後、細胞傷害性の評価をクリスタルバイオレット染色を用いて行う。インターフェロン β の内部標準およびPEG結合体の内部標準をそれぞれのアッセイプレートにおいてサンプルと同時に試験する。この標準を、天然のヒト線維芽細胞インターフェロン参照標準 (WHO Second International Standard for Interferon, Human Fibroblast, Gb-23-902-53) に対して校正する。それぞれのアッセイプレートはまた、いかなる種類のインターフェロン β もEMCも含まない細胞増殖コントロールウェルを含み、そしてウイルスコントロールウェルは、細胞およびEMCを含むがインターフェロン β を含まない。標準およびサンプルを含有するコントロールプレート

をまた、細胞増殖へのサンプルの効果（もし存在するならば）を決定するために準備する。これらのプレートにウイルスの添加なしに染色する。

【0146】

サンプルおよび標準を、それぞれの2つの複製アッセイプレート上で二連で試験し、1サンプルあたり4つのデータポイントを得る。4つの複製の幾何平均濃度を報告する。このアッセイにおける検出限界は10ユニット（U）/mIである。

【0147】

ネオプテリンの血清濃度を市販のアッセイを用いて、臨床薬理学的単位で決定する。

【0148】

（薬物動態学的方法および統計学的方法）

Rstrip™ソフトウェア（MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT）を用いて、薬物動態モデルにデータを適合させる。幾何平均濃度を各群について時間でプロットする。アッセイ結果は希釈度で表現されるので、幾何平均は、算術平均よりも適切であると考えられる。血清インターフェロンレベルをベースライン値について調節し、そして検出不能な血清濃度は5 U/mlに設定する。これは、検出下限の1/2を示す。

【0149】

IV注入データについては、2コンパートメントのIV注入モデルが、各被験体についての検出可能な血清濃度に適合する、そしてSCデータは、2コンパートメント注射モデルに適合する。

【0150】

以下の薬物動態学的パラメーターを算出する：

- (i) 観察されたピーク濃度、 C_{max} (U/ml)；
- (ii) 台形公式を用いる、0～48時間の曲線下面積、AUC；
- (iii) 排泄半減期；

および、IV注入データ（IVが用いられる場合）から、以下を算出する：

- (iv) 分布半減期（h）；

(v) クリアランス (ml/h)

(vi) 見かけの分布容積、Vd (L)。

【0151】

WinNonlin (Scientific Consulting Inc., Apex, NC) ソフトウェアを用いて、SC注射およびIM注射後、排泄半減期を算出する。

【0152】

ネオプテリンについては、各群について、時間による算術平均を示す。ベースラインからの最大変化 E_{max} を算出する。 C_{max} 、AUCおよび E_{max} を一元分散分析に供し、投薬群を比較する。 C_{max} およびAUCを、分析の前に対数変換し；幾何平均を報告する。

【0153】

(実施例6：アカゲザルにおけるPEG化されたインターフェロン $\beta-1a$ およびインターフェロン $\beta-1a$ の薬物動態の比較評価)

(材料および方法)

インターフェロン $\beta-1a$ またはPEG化IFN $\beta-1a$ を実施例5の一般プロトコールに記載のように、静脈内 (IV) または皮下 (SC) 経路により、1日目、および29日目に再度アカゲザルに投与した。1日目、6匹のサルに、IFN $\beta-1a$ (1経路あたり3匹) を与え、そして別の6匹のサルにPEG化IFN $\beta-1a$ (1経路あたり3匹) を与えた。29日目に、この用量を繰り返した。このIV用量を、桃側皮静脈または伏在静脈に緩徐なボラス注射で投与した。

【0154】

このSC用量を注射部位を剃毛した後、背中 of 皮膚の下に投与した。特定の時点で、大腸静脈を介して血液を収集し、血清を得るために凝血させた。血清を、確証 (バリデート) された抗ウイルスCPE方法を用いて機能的薬物のレベルについて、そして血清ネオプテリンおよび β 2マイクログロブリンレベルについて (活性の薬力学測定値として) 分析した。WinNonlin バージョン2.0ソフトウェア (Scientific Consulting Inc., A

perx、NC)を用いて薬物動態パラメーターを算出した。

【0155】

標準的なモデル-独立方法(非コンパートメント分析)により濃度データを分析して、薬物動態学的パラメーターを得た。台形公式を用いて、曲線下面積(AUC)を算出した。Microsoft Excelバージョン5.0のソフトウェア(Microsoft Corp., Redmond WA)を使用して、算術平均および標準偏差を、統計解析を実行した。定量の下限(BLQ)と報告された濃度値は、薬力学的分析において用いなかった。異なるコンピュータおよびコンピュータプログラムが、異なつて数を切り捨てる(round off)かまたは切り捨てる(truncate)という事実に起因して、いくつかの表における値(例えば、平均、標準偏差または個々の値)は、他の表における値から、個々に算出したデータから、または統計学的分析データからわずかに異なり得る。データの統合性も解釈も、これらの相違による影響を受けなかった。

【0156】

(結果および考察)

投与の各々の経路の中で、PEG化されたIFN β -1aは、より高い生体有用性(血清中濃度-時間曲線の下下面積によって測定される場合)を呈した。加えて、SC経路によって投与される場合、PEG化されたIFN β -1aは、IFN β -1aと比べて、より高い絶対的な生体有用性を有した。本発明者らは、表5に薬物動態学的パラメーターを要約する。IV経路およびSC経路の両方によるPEG化されたIFN β -1aの投与は、半減期の延長およびIFN β -1aのAUCの増大を生じる。

【0157】

【表5】

表5:

平均(±標準偏差) IFN- β -1aまたはPEG化されたIFN- β -1aのアカゲザルに対するIV投与またはSC投与(用量1)後の薬物動態パラメーター^a

| 処方物 (投与の経路) | C _{max} | T _{max} | AUC (U·hr/mL) | CL (mL/kg) | V _{ss} (mL/kg) | T1/2 |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|----------------------------|----------------|
| IFN- β -1a (IV) | 6400(±0) | 0.083 (±0) | 4453 (±799) | 229 (±38) | 543 (±147) | 3.2 (±1.4) |
| PEG化IFN- β -1a(IV) | 10800 (±3811) | 0.033 (±0) | 34373 (±3601) | 29 (±3) | 250 (±30) | 9.5 (±2.1) |
| IFN- β -1a (SC) | 277 (±75) | 5.3 (±1.2) | 4753 (±3170) | N/A | N/A | 10.0 (±2.9) |
| PEG化 IFN- β -1a (SC) | 1080 (±381) | 3.3 (±1.2) | 42285 (±5934) | N/A | N/A | 22.0 (±3.4) |

^a n = 3

【0158】

初回用量のIV投与後、IFN- β -1aおよびPEG化IFN- β -1aの平均(±標準偏差)ピーク血清濃度(C_{max})は、それぞれ、6400(±0)および10800(±3.5)U/mLであった。平均(±標準偏差)AUC値は、それぞれ、4453(±799)および34373(±3601)U·hr/mLであった。最初のSC投与後、IFN- β -1aおよびPEG化IFN- β -1aの平均(±標準偏差)C_{max}は、それぞれ、277(±75)および1080(±381)U/mLであった。平均(±標準偏差)AUC値は、それぞれ、4753(±3170)および44952(±1443)U·hr/mLであった。

【0159】

血清ネオプテリンおよび血清 β 2ミクログロブリンの両方のレベルは、IFN- β およびPEG化されたIFN- β での処置後、上昇し、これは産物の薬理的活性を示した。使用する高用量の試験化合物で、投与のいずれの経路によって

も、IFN β -1aおよびPEG化されたIFN β -1aの薬理学的活性の相違は存在しなかった（データ示さず）。

【0160】

（実施例7：種々の様式の投与後のラットにおけるPEG化インターフェロン β -1aおよびインターフェロン β -1aの薬物動態学の比較評価）

この研究の目的は、いくつかの投与経路による、インターフェロン β -1およびPEG化されたインターフェロン β -1aのバイオアベイラビリティ比較を決定することであった。

【0161】

（材料および方法：）

本発明者らは、1つの経路／処方物につき2匹のラットを用いる薬物動態学的解析のため、雌性Lewisラット（それぞれ190グラムで）を使用した。ラットに、頸静脈カニューレを挿入し、そしてヒトインターフェロン β -1aまたは5KのPEG化されたヒトインターフェロン β -1aまたは20Kのヒトインターフェロン β -1a（50mMのリン酸ナトリウム、100mMのNaCl、pH 7.2中の、14mg/mlのHSAからなるビヒクル中）を、静脈内に腹腔内に、経口的に、皮下的に、または気管内に投与した。72時間の期間を通じて、0.5分、15分、30分、75分、3時間、24h、48時間および72時間に血液を数回処理した。このプロトコルを表6に示す。血清中にインターフェロン β を検出するため血清サンプル上で細胞毒性効果（CPE）バイオアッセイを、実行した。改変されていないインターフェロン β -1aおよび20KのPEGを用いてPEG化されるインターフェロン β -1aによって生じる結果を、表7に示す。全ての場合において、PEG化は、 $t_{1/2}$ およびAUCの有意な増加を生じた。

【0162】

【表6】

| | 20K PEG化 NIFM ₁₂ | 非PEG化 NIFM ₁₂ |
|---------|--|---------------------------------|
| 静脈内 | 0, 5, 15, 30, 75 分, 3, 24, 48, 72 時間 | 0, 5, 15, 30, 75 分, 3, 5 時間 |
| 腹腔内 | 0, 5, 15, 30, 75 分, 3, 24, 48, 72 時間 | 0, 5, 15, 30, 75 分, 3, 5 時間 |
| 経口(口腔内) | 0, 15, 30, 60, 90 分, 4, 7, 24, 48, 72 時間 | 0, 15, 30, 60, 90 分, 3, 5, 7 |
| 皮下 | 0, 30, 60, 90 分, 4, 7, 24, 48, 72 時間 | 0, 30, 60, 90 分, 3, 5, 7, 24 時間 |
| 気管内 | 0, 30, 60, 90 分, 4, 7, 24, 48, 72 時間 | 0, 30, 60, 90 分, 3, 5, 7, 24 時間 |

【0163】

【表7】

表 7

ラットにおける、インターフェロン β -1a (IFN) およびPEG化されたIFN- β 1a (IFN-PEG) のIV投与、SC投与、IP投与、またはIT投与後の薬物動態学的パラメーター

| 処方物 (投与経路) | C _{max} (U/mL) | T _{max} (時間) | AUC/用量 (Uhr)/(mL μ g) | T _{1/2} (時間) |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| IFN (IV, 20 μ g用量) | 64000 | 0.25 | 3035 | 1.25 |
| IFN-PEG (IV, 3 μ g用量) | 23970 | 0.08 | 47728 | 8.44 |
| IFN (SC, 20 μ g用量) | 2400 | 1.00 | 464.4 | 0.96 |
| IFN-PEG (SC, 3 μ g用量) | 2400 | 7.00 | 14688 | 11.9 |
| IFN (IP, 20 μ g用量) | 26000 | 1.25 | 4159 | 1.53 |
| IFN-PEG (IP, 3 μ g用量) | 9700 | 1.25 | 52148 | 16.2 |
| IFN (IT, 15 μ g用量) | 240 | 1.5 | 70.7 | 1.29 |
| IFN-PEG (IT, 15 μ g用量) | 270 | 7.0 | 233.5 | 6.21 |

【0164】

(実施例 8: ポリマー結合体化インターフェロン β -1aの抗脈管形成効果: インビトロにおける内皮細胞増殖を阻害するPEG化されたインターフェロン β -1aの能力の評価)

ヒト血管内皮細胞 (Cell Systems、カタログ番号2VO-P75) およびヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Cell Systems、カタログ番号2M1-C25) を、CS-C Medium Kit (Cell Systems)

ms、カタログ番号4Z0-500)を用いて培養中で維持する。実験の24時間前に、細胞をトリプシン処理して、アッセイ培地(90%のM199および10%のウシ胎仔血清(FBS))において再懸濁して、所望の細胞密度に調節する。次いで、細胞を、ゼラチン被覆した24または96ウェルプレートに、それぞれ12,500細胞/ウェルまたは2,000細胞/ウェルのいずれかでプレートする。

【0165】

一晚のインキュベーションの後、アッセイ培地を、20ng/mlのヒト組換え塩基性線維芽細胞増殖因子(Becton Dickinson, カタログ番号40060)および種々の濃度の結合体化インターフェロン- β -1aタンパク質および非結合体化インターフェロン- β -1aタンパク質、または陽性コントロール(エンドスタチンは、bFGFに対する抗体であり得るので、陽性コントロールとして用いられ得る)を含有する新鮮培地と交換する。最終容積は、24ウェルプレートで0.5ml、または96ウェルプレート中で0.2mlに調節する。

【0166】

72時間以後、細胞を、Coulter計数のためにトリプシン処理し、CyQuant 蛍光読取りのために凍結させるか、または[3H]チミジンによって標識する。結合体化されたインターフェロン- β 1aおよび非結合体化インターフェロン- β 1aによるインビトロでの内皮細胞増殖の阻害は匹敵するものであった。これは、この設定においてインターフェロンが機能する能力を、PEG化が妨げなかったことを示した。

【0167】

このインビトロアッセイは、インビボで抗血管形成性の効果を表し得る血管内皮細胞増殖に対する効果について、本発明のヒトインターフェロン β 分子を試験する。O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N.

Fukal, G. Vasios, W. Lane, E. Flynn, J. Birkhead, B. OlsenおよびJ. Folkman (1997). Endostatin: An Endogenous Inhibitor of A

ngiogenesis and Tumor Growth. Cell 88
、277~285を参照のこと。

【0168】

(実施例9：結合体化インターフェロン β -1aの抗脈管形成効果および血管新生効果を試験するためのインビボモデル)

本願明細書において記載されている分子の抗脈管形成効果および抗新生血管効果について試験するために種々のモデルが開発された。これらのモデルのいくつかは、米国特許5,733,876号(1998年3月31日：「Method of Inhibiting angiogenesis」)および同第5,135,919号(1992年8月4日：「Method and a pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis」)において記載されている。他のアッセイとしては、S. TaylorおよびJ. Folkmanの殻なし(shell-less)漿尿膜(CAM)アッセイ(Nature、297、307(1982)およびR. Crum、S. SzaboおよびJ. Folkman; Science. 230. 1375(1985); Folkman、J.らのマウス背部気嚢法(mouse dorsal air sac method)脈管形成モデル; J. exp. Med., 133, 275(1971)、ならびにGimbrone、M. A. Jr.ら、J. Natl. Cancer Inst. 52, 413(1974)のラット角膜マイクロポケットアッセイ(ここでは、各角膜に、EVA(エチレン酢酸ビニルコポリマー)ペレットに植えつけられた、500ngの塩基性FGF(ウシ、R&D Systems, Inc.)を移植することにより、Sprague-Dawley系統(Charles River, Japan)の成体雌性ラットにおいて、角膜血管新生が誘導される)が挙げられる。

【0169】

動物モデルにおける抗脈管形成効果について、PEG化されたマウスのインターフェロン β を試験するための他の方法は、もともとCancer Chemotherapy Reports、第3部、第3巻、2号(1972年9月)お

および補遺の In Vivo Cancer Models、1976-1982 (1984年2月、NIH公開番号84-2635)に記載のように、新規な潜在的な抗癌剤をスクリーニングするためのプロトコルを含む(がこれに限定されない)。

【0170】

I型インターフェロンの種間障壁のため、げっ歯類モデルにおけるポリマー結合体化インターフェロン β の抗脈管形成活性を評価するために、ポリマー結合体化げっ歯類インターフェロン β 調製物を生成する。このようなスクリーニング方法は、皮下に移植されたLewis Lung Carcinoma上のPEG化されたマウスインターフェロン β の抗脈管形成効果について試験するためのプロトコルによって例証される。

【0171】

(腫瘍系統の起源：)

C57BL/6マウスの肺の癌腫として、1951年に自然に発症した。

【0172】

(試験手順の概要：) 腫瘍フラグメントを、B6D2F1マウスの腋窩部に皮下移植する。試験剤(すなわち、本発明のPEG化インターフェロン)を、腫瘍の移植後、種々の日数にて、種々の用量で、皮下(SC)、または腹腔内(IP)投与する。測定されるパラメーターは、メジアン生存時間である。結果を、コントロール生存時間のパーセンテージとして表す。

【0173】

(動物：)

生殖：C57BL/6マウス

試験：B6D2F1マウス

重量：マウスは、雄性については18g、そして雌性については17gの最小重量であり、3gの重量範囲内であればならない

性別：1つの実験の全ての検査およびコントロール動物については1つの性別を用いる

供与源：当然ながら、実現可能ならば、1つの実験において全ての動物について

て1つの供給源

(実験のサイズ:)

1 試験群あたり10動物

(腫瘍移植:)

(生殖:)

フラグメント: s. c. ドナー腫瘍の2~4mmのフラグメントを調製する

時間: 13日~15日

部位: 鼠径部の穿刺で腋窩部にフラグメントを s. c. 移植する。

【0174】

(試験:)

フラグメント: s. c. ドナー腫瘍の2~4mmフラグメントを調製する

時間: 13日~15日。

【0175】

部位: 鼠径部の穿刺で腋窩部にフラグメントを s. c. 移植する。

【0176】

(試験スケジュール:)

0日目: 腫瘍を移植する。細菌培養を行う。あらゆる奇数実験において陽性コントロール化合物を試験する。材料を調製する。毎日、死亡を記録する。

1日目: 培養を点検する。汚染される場合、実験を廃棄する。動物を無作為化する。指示される(1日目およびその後の日)ように、処理する。

2日目: 培養を再点検する。汚染される場合、実験を廃棄する。

5日目: 2日目、および初回の試験剤の毒性評価の日、秤量する。

14日目: 早期死亡日をコントロールする。

48日目: とらない日をコントロールする。

60日目: 実験をおわり、評価する。肺にひどい腫瘍がないか調べる。

【0177】

(品質管理 (Quality Control):)

あらゆる奇数実験において、陽性コントロール化合物 (NSC 26271 (10mg/kg/注射の用量のCytosan)) を予定する。このためのレジ

メンは、1日目のみの腹腔内である。陽性コントロールについての試験／コントロールの下限は140%である。許容可能な未処理コントロールのメジアン生存時間は19～35、6日である。

【0178】

(評価:)

測定されるパラメーターは、1日目および5日目についての、メジアン生存時間、Compute平均動物体重であり、全ての試験群について試験／コントロール比を計算する。実施(staging)日および最終評価日の平均の動物体重を計算する。試験／コントロール比を、5日目に65%をこえる生存動物を有する全ての試験群について計算する。86%より小さい試験／コントロール比の値は、毒性を示す。過剰の体重変化の相違(試験からコントロールを減算)が、また、毒性を評価する際に用いられ得る。

【0179】

(活性のための基準:)

140%以上の初期の試験／コントロール比が、中程度の活性を示すのに必要であると考えられる。150%以上の再現可能な試験／コントロール比の値は、有意な活性と考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1. I型インターフェロンレセプター鎖の細胞外ドメインを含むダイマー融合タンパク質IFAR2/Ig(ヒトIgG1定常ドメインに融合されたIFNAR2外部ドメイン(ectodomain))に対する、アラニン置換インターフェロン-β-1a変異体の結合。IFNAR2レセプター鎖についてのアラニン置換IFN変異体(A1～E)の結合親和性を、実施例1(部分節D)に記載の通りに決定した。ヒストグラムは、野生型hIS-IFN-βに対する、このアッセイにおけるそれらの結合親和性を表す(%w.t.)。%w.t.値を、(野生型hIS-IFN-βの親和性)/変異体IFN-βの親和性の100倍として算出した。個々の実験(N=3)についての%w.t.(白丸)および実験セットについての平均%w.t.(×)を示す。変異体A2、AB1、AB

2およびEは、w. t. h i s - I F N - β の E C 5 0 ($^{\circ}$) よりも 5 0 0 倍高い濃度では、I F N A R 2 / F c を結合しなかった。

【図2】

図2. D a u d i B u r k i t t リンパ腫細胞において発現されたI型インターフェロン細胞表面レセプター複合体(「I F N A R 1 / 2 複合体」)へのアラニン置換インターフェロン- β -1 a 変異体の結合。アラニン置換変異体(A 1 ~ E)のレセプター結合特性を、実施例1(部分節D)に記載される、F A C S ベースの細胞表面レセプター結合アッセイを使用して決定した。このヒストグラムは、野生型 h i s - I F N - β に対する、このアッセイにおけるそれらのレセプター結合親和性(%w. t.)を表す。各変異体についての%w. t. を、(野生型 h i s - I F N - β の親和性) / 変異体 I F N - β の親和性の100倍として算出した。個々の実験についての%w. t. 値(白丸)および実験セットについての%w. t. 値(X)の平均を示す。

【図3】

図3. アラニン置換インターフェロン- β -1 a 変異体の抗ウイルス活性。アラニン置換変異体(A 1 ~ E)の抗ウイルス活性を、実施例1(部分節E)に記載のEMCウイルスを用いてチャレンジしたヒトA 5 4 9 細胞において決定した。このヒストグラムは、野生型 h i s - I F N - β に対する、このアッセイにおけるそれらの活性(%w. t.)を表す。%w. t. を、(野生型 h i s - I F N - β の濃度[50 c p e]) / 変異体 I F N - β の濃度[50 c p e]の100倍として算出した。複数のアッセイについての%w. t. (白丸)および実験セットについての平均(X)を示す。

【図4】

図4. アラニン置換インターフェロン- β -1 a 変異体の抗増殖活性。アラニン置換変異体(A 1 ~ E)の抗増殖活性を、実施例1(部分節E)に記載のように、D a u i B i e k i t t リンパ腫細胞において決定した。このヒストグラムは、野生型 h i s - I F N - β に対する、このアッセイにおけるそれらの活性(%w. t.)を表す。%w. t. を、(w. t. h i s - I F N - β の濃度(50%増殖阻害) / 変異体 I F N - β の濃度(50%増殖阻害))の100倍と

して計算した。複数のアッセイについての%w. t. (白丸)および実験セットについての平均(×)を示す。

【図5】

図5. アラニン置換インターフェロノン-β-1 a 変異体の相対的抗ウイルスおよび抗増殖活性。抗ウイルスアッセイ (x 軸) および抗増殖アッセイ (y 軸) におけるアラニン置換変異体 (A 1 ~ E) の相対活性を、比較した。図3および4に示した平均パーセント野生型 h i s - I F N - β (%w. t. ×) を、この比較のために使用した。両方の活性における協調変化を提示するこれらの変異体は、垂直線におちついた。抗増殖活性における変化に対して不釣り合いである抗ウイルス活性における変化を提示するこれらの変異体は、対角線から有意にずれた (D E 1、D、C 1)。有意性を、使用して平均%w. t. 値に固有の標準偏差を考慮して決定した。

【図6】

図6. ペプチドマッピングによるPEG化の部位の局在。PEG化および未改変のインターフェロノン-β-1 a を、ペプチドマッピング分析に供した。サンプルを、エンドプロテイナーゼL y s - C で消化し、そしてC₄カラムでの逆相HPLCに供した。このカラムを、0. 1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの0~70%の勾配を用いて展開した。このカラム溶出物を、214nmでモニターした。パネルa、未改変のインターフェロノン-1 a。パネルb、PEG化インターフェロノン-β-1 a。矢印は、アミノ酸残基1~19を含む、インターフェロノン-β-1 a のN末端エンドプロテイナーゼL y s ペプチドの溶出位置を印付ける。

【図7】

図7. 結合体化および非結合体化インターフェロノン-β-1 a の抗ウイルス活性。X軸上に示した濃度でのインターフェロノン-β-1 a またはPEG化インターフェロノン-β-1 a の活性を、脳心筋炎ウイルスを用いてチャレンジしたヒト肺癌腫 (A 5 4 9) 細胞を使用して抗ウイルスアッセイにおいて評価した。ウイルスとのインキュベーションの2日後に、生存細胞を、MTTで染色し、このプレートで、450nmで読み取り、そして細胞生存度を反映する吸光度をY軸に

示す。標準偏差をエラーバーとして示す。50%のウイルス殺傷を提供した（「50%細胞変性効果」）（50%の最大OD450）、インターフェロン-β-1aまたはPEG化インターフェロン-β-1aの濃度は、約11 pg/mlであり、そしてPEG化インターフェロン-β-1aについての50%細胞変性効果は、約11 pg/mlであった。

【図8】

図8. 熱変性を使用する結合体の安定化の評価。20 mM HEPES pH 7.5、20 mM NaCl中のPEG化インターフェロン-β-1aおよび未処理インターフェロン-β-1aコントロールを、1℃/分の固定速度で加熱した。変性を、280 nmでの吸光度変化をモニターすることによって追跡した。

(a) 未改変インターフェロン-β-1a (b) PEG化インターフェロン-β-1a。

【図9】

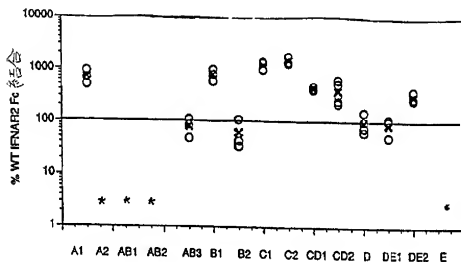
図9. インターフェロン-β-1aまたはPEG化インターフェロン-β-1aで処置したマウスの血漿におけるインターフェロン-β-1a抗ウイルス活性の測定。マウスに、50,000ユニットのインターフェロン-β-1aまたは50,000ユニットのPEG化インターフェロン-β-1a（20K PEGを含む）のいずれかをiv注射する。これらのマウスの血液を、X軸上に示される、インターフェロン注射後の様々な時間で眼窩採血を介して得る。各時点で採血した少なくとも3匹のマウスが存在し、そして血漿を調製し、そしてインターフェロン-βの活性が脳筋炎ウイルスでチャレンジしたヒト肺癌腫（A459）細胞を使用して抗ウイルスアッセイにおいて評価するまで凍結する。生存細胞をMTT溶液で染色し、血漿を450 nmで読み取り、細胞生存度およびインターフェロン-β活性を反映する吸光度を決定した。標準曲線を、インターフェロン-β-1aを使用して各プレートについて作製し、そして使用して、各サンプルにおけるインターフェロン-β活性の量を決定した。個々の動物からのデータを示す。

【図10】

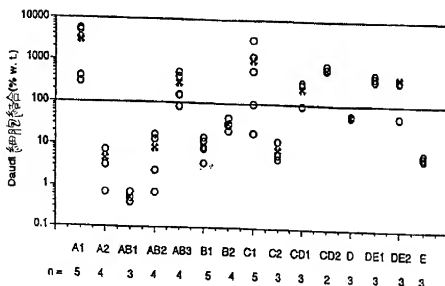
図10. ヒスチジンタグ化インターフェロン-β遺伝子の全長DNA配列およ

びそのタンパク質産物。ヒスチジンタグ化IFN- β -1aの全長DNA配列（配列番号1）およびタンパク質配列（配列番号2）を示す。切断したVCAM-1シグナル配列は、ヒスチジンタグ（His₆、4～9位）の上流の3アミノ末端残基（SerGlyGly）を残す。エンテロキナーゼリンカー配列（AspAspAspAspLys）を、スパーサー（10～12位、SerSerGly）によってヒスチジンタグから分離する。天然のIFN- β -1a配列は、位置（Met18～Asn183）におよぶ。

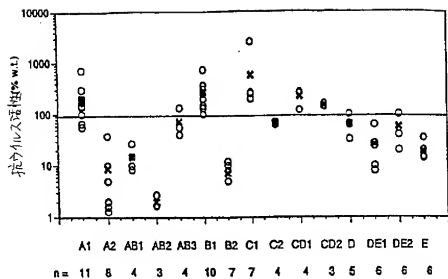
【図1】



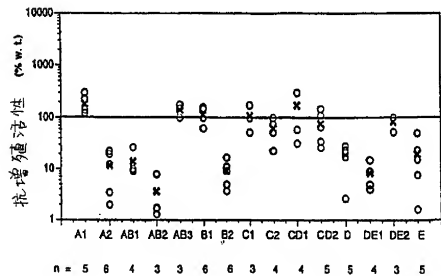
【図2】



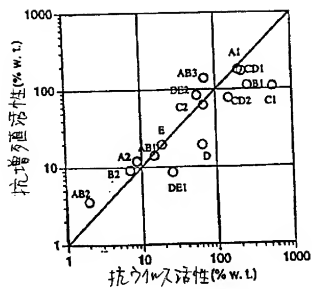
【图3】



【图4】



【図5】



【図6】

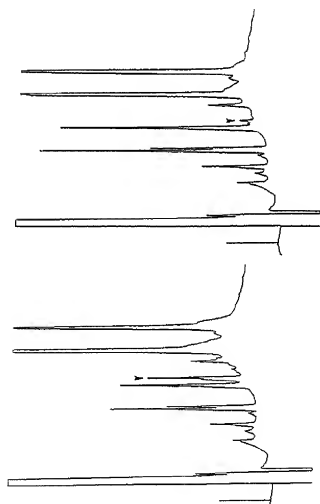
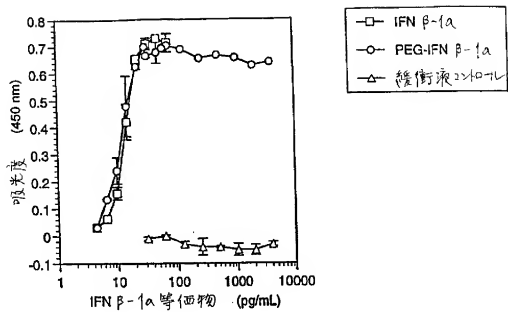


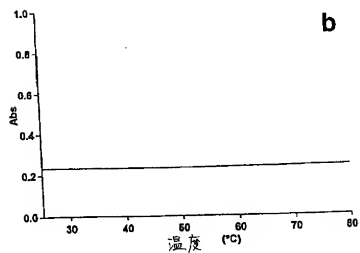
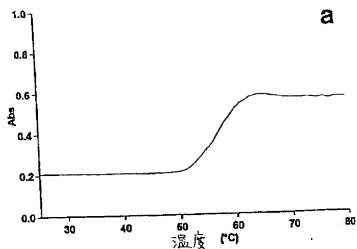
FIG. 6B

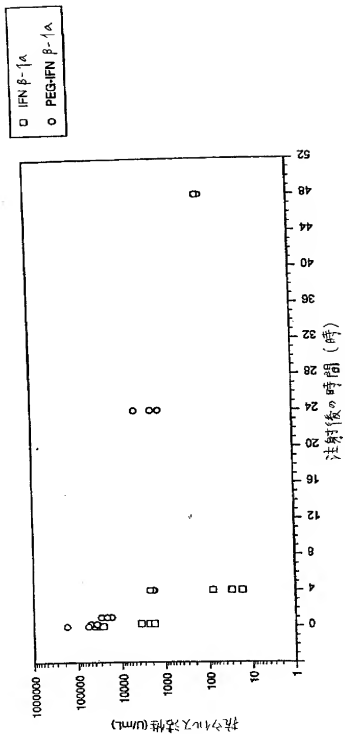
FIG. 6A

【图 7】



【图8】





【図6】

1 TCCGGGGGCC ATCATCATCA TCATCATACC TCCGGGAGAC ATGATGACAA GATGAGCTAC
 AGGCCCCCGG TAGTAGTAGT AGTAGTATCG AGGCCTCTGC TACTACTGTT CTACTCGATG
 1 ▶ Ser Gly Gly yH i sH i sH i sH i sH i sSer Ser Gly AspA sPAspAsply sMetSer Tyr
 61 AACTTCCTTG GATTCTACTA AAGAAGCAGC AATTTTCAGT GTCAGAAGCT CCTGTGGCAA
 TTGAACGAAC CTAAGGATGT TTCTTCGTCTG TTAAAACTCA CAGTCTTCGA GGACACCCGT
 21 ▶ AsnLeuLeuG l yPheLeuG l nArgSer Ser AsnPheGlnC ysGlnLysLe uLeuTrpGln
 121 TTGAATGGGA GGCTTGAATA CTGCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG
 AACTTACCCT CCGAAGTTAT GACGGAGTTC CTGCTCTACT TGAAGCTGTA GGGACTCTCT
 41 ▶ LeuAsnGlyA r gLeuG l uTy r CysLeuLys AspArgMetA snPheAsp l ePr oG l uG l u
 181 ATTAAGCAGC TGCAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TGACCATCTA TGAAGTCTC
 TAATTCCTCG ACGTCGTCAA GGTCTTCCTC CTGCGGCGTA ACTGGTAGAT ACTCTACGAG
 61 ▶ IleLysGlnL euG l nG l nPh eG l nLysG l u AspAlaAlaL euThr l l eTy r G l uMetLeu
 241 CAGAACATCT TTGCTATTTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA CTGGCTGGAA TGAAGCTATT
 GTCTTGATGA AACGATAAAA GTCTGTTCTA AGTAGATCGT GACCGACCTT ACTCTGATAA
 81 ▶ GlnAsnIleP heAla l l ePh eArgGlnAsp SerSerSer T hr GlyTrpAs nG l uThr l l e
 301 GTTGAGAACC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT CAGATAAACC ATCTGAAGAC AGTCTTGAA
 CAACTCTTGG AGGACCGATT ACAGATAGTA GTCTATTTGG TAGACTTCTG TCAGGACCTT
 101 ▶ Val Gl uAsnL euLeuAlaAs nVal Tyr H i s G l n l l eAsnH i sLeuLysTh rValLeuG l u
 361 GAAAACCTGG AGAAAAGA TTTCAACAGG GGAACAACTCA TGACGAGTCT GCACCTGAAA
 CTTTTTGACC TCTTCTTCT AAAGTGGTCC CCTTTTGAGT ACTCGTCAGA CGTGACCTTT
 121 ▶ Gl uLysLeuG l uLysG l uAs pPheThrArg GlyLysLeuM etSerSerLe uH i sLeuLys
 421 AGATATTATG GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG
 TCTATAATAC CTTCTAAGA CTAATGGAC TTCGGTTTCC TCATGTCACT GACACGGACC
 141 ▶ ArgTyr TyrG l yArg l l eLe uH i sTyrLeu LysAlaLysG l uTyrSerH i sCysAlaTrp
 481 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CTAAGGAAC TTTTACTTCA TTAACAGACT TACAGGTTAC
 TGGTATCAGT CTCACCTTTA GGATTCCTTG AAAATGAAGT AATTGTCTGA ATGTCCAATG
 161 ▶ Thr l l eValA r gVal Gl u l l eLeuArgAsn PheTyrPhe l l eAsnArgLe uThrGlyTyr
 541 CTCCGAAAC
 GAGGCTTTG
 181 ▶ LeuArgAsn

FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/US 99/24201

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48 A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|--|
| X | <p>WO 87 00056 A (CETUS CORP) 15 January 1987 (1987-01-15)</p> <p>abstract page 5, line 28 - page 7, line 9 page 8, line 14 - line 32 page 13, line 15 - line 35 examples VI, VII claims 1-10</p> <p>---</p> <p>-/-</p> | <p>1, 2, 5, 6, 9-13, 16-20, 23-30, 32-37, 39, 40</p> |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"F" inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention

"G" document of particular relevance: the claimed invention cannot be described novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"H" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"I" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2000

Date of mailing of the international search report

07.07.2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 5516 Patentstr. 2
D-6000 N. 1180
Tel. (+31-70) 340-3043, Te. 31 551 0000
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Taylor, G.N.

Form PCT/ISA216 (proposed sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

later: oral Application No
PCT/US 99/24201

| G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|--|
| Category * | Citation of document, with indicator where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| E | <p>WO 99 55377 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;ROBERTS MICHAEL J (US); HARRIS MILTON (U) 4 November 1999 (1999-11-04)</p> <p>abstract page 1, line 8 - line 15 page 5, line 20 - line 35 page 6, line 32 -page 8, line 17 examples 1-6 claims 1-25</p> | <p>1,2,5,6, 9-13, 16-20, 23-30, 32-37, 39,40</p> |
| A | <p>WO 95 13090 A (ENZON INC) 18 May 1995 (1995-05-18)</p> <p>abstract page 2, line 23 -page 3, line 5 examples 1-10 claims 1-44</p> | <p>1,2,5,6, 9-13, 16-20, 23-30, 32-37, 39,40</p> |

2

Form PCT/ISA/216 (continuation of national phase) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 99/24201

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 25-40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 3,4,7,8,14,15,21,22,31,38
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that an meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(g).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

The International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched with out effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/BA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 3,4,7,8,14,15,21,22,31,38

Present claims 3, 4, 7, 8, 14, 15, 21, 22, 31 and 38 relate to a products defined by reference to a desirable characteristic or property, namely:

"wherein the glycosylated interferon-beta ... is more active than interferon-beta-1b" (claim 3);

"wherein the interferon-beta-1a retains 0.5 to 1 times the potency of interferon-beta-1a lacking said polymer" (claim 4);

"stable, aqueously soluble" and "wherein the labile bond is cleavable by biochemical hydrolysis and/or proteolysis" (claim 22);

Moreover, the whole subject-matter of claims 7, 8, 14, 15, 21, 31 and 38 is defined in terms of desirable characteristics.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, claims 3, 4, 7, 8, 14, 15, 21, 22, 31 and 38 also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products as defined in the claims searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 65.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/US 99/2401

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 8700056 A | 15-01-1987 | AT 59301 T | 15-01-1991 |
| | | AU 580431 B | 12-01-1989 |
| | | AU 5970086 A | 30-01-1987 |
| | | CA 1291708 A | 05-11-1991 |
| | | DE 3676670 D | 07-02-1991 |
| | | DK 97987 A | 25-02-1987 |
| | | EP 0229108 A | 22-07-1987 |
| | | FI 93424 B | 30-12-1994 |
| | | FI 870809 A | 25-02-1987 |
| | | GR 861641 A | 12-09-1986 |
| | | IE 59406 B | 23-02-1994 |
| | | IL 79235 A | 31-01-1991 |
| | | IN 163200 A | 20-08-1988 |
| | | JP 2524586 B | 14-08-1996 |
| | | JP 62503171 T | 17-12-1987 |
| | | KR 9004801 B | 06-07-1990 |
| | | MX 174442 B | 17-05-1994 |
| | | NO 870779 A,B | 25-02-1987 |
| | | NZ 216618 A | 29-05-1989 |
| | | PH 25004 A | 28-01-1991 |
| | | PT 82834 A,D | 01-07-1986 |
| | | US 4917889 A | 17-04-1990 |
| | | US 5206344 A | 27-04-1993 |
| | | US 4766106 A | 23-08-1988 |
| | | ZA 8604766 A | 24-02-1988 |
| WO 9955377 A | 04-11-1999 | AU 3767499 A | 16-11-1999 |
| WO 9513090 A | 18-05-1995 | AU 691225 B | 14-05-1998 |
| | | AU 1179895 A | 29-06-1995 |
| | | EP 0730470 A | 11-09-1996 |
| | | HU 75533 A | 28-06-1997 |
| | | JP 9506087 T | 17-06-1997 |
| | | NZ 276943 A | 26-02-1998 |
| | | US 6042822 A | 28-03-2000 |
| | | US 5711944 A | 27-01-1998 |
| | | US 5951974 A | 14-09-1999 |

First PCT/ISA/10 (adding family member(s))

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード ⁷ (参考) |
|--------------------------|--|---------|-------------------------|
| A 6 1 P | 29/00 | A 6 1 P | 31/12 |
| | 31/12 | | 35/00 |
| | 35/00 | | 37/00 |
| | 37/00 | | 43/00 |
| | 43/00 | 1 0 5 | |
| C 0 7 K | 14/565 | C 0 7 K | 14/565 |
| | 16/00 | | 16/00 |
| | 19/00 | | 19/00 |
| | | A 6 1 K | 37/66 |
| (81)指定国 | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW | | |
| (72)発明者 | ランケル, ローラ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, リー ストリート ナンバー 7 37 | | |
| (72)発明者 | ブリッケルマイヤー, マーゴット アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01921, ボックスフォード, バインハースト ドライブ 20 | | |
| (72)発明者 | ホイッティ, エイドリアン アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01748, ホブキンソン, サウス ミルストリート 71 | | |
| (72)発明者 | ホクマン, ボーラ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02459, ニュートン, ホワイト アベニュー 14 | | |

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC03 CC27 EE23 FF63
 FF68 GG50
 4C084 AA02 AA03 BA44 DA23 NA03
 NA13 ZB211 ZB261
 4C085 AA35 EE03
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41
 BA53 BA57 BA62 CA40 DA17
 DA76 EA20 EA50 FA51 FA53
 FA74 FA81 GA22 GA23